



BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

11

**RECEIVED**

MAR 07 2003

TECH CENTER 1600/2900

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 100 32 379.0
Anmeldetag: 06. Juli 2000
Anmelder/Inhaber: Aventis CropScience GmbH,
Frankfurt am Main/DE
Bezeichnung: Promotoren zur Genexpression in Karyopsen von
Pflanzen
IPC: C 12 N, A 01 H

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 26. April 2001
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Faust

Aventis CropScience GmbH
Beschreibung

AGR 2000/M 215
Dr.GRU/pp

5 Promotoren zur Genexpression in Karyosomen von Pflanzen

Die vorliegende Erfindung betrifft Promotoren, die eine karyosenspezifische Expression von Ihnen kontrollierter codierender Nukleotidsequenzen bewirken, die zur gewebespezifischen Genexpression in Pflanzen geeignet sind.

10 Expressionskassetten, rekombinante Vektoren und Wirtszellen, die solche Promotoren enthalten, damit transformierte transgene Pflanzenzellen und Pflanzen, sowie Verfahren zur Herstellung transgener Pflanzenzellen und Pflanzen.

Nachfolgend werden Dokumente aus dem Stand der Technik zitiert, deren Offenbarungsgehalt hiermit durch Referenz Teil dieser Anmeldung ist.

Der Einsatz von Pflanzen, die mit Hilfe gentechnischer Verfahren in ihrem Erbgut verändert wurden, hat sich in vielen Bereichen der Landwirtschaft als vorteilhaft erwiesen, um bestimmte Eigenschaften auf Nutzpflanzen zu übertragen. Die vornehmlichen Ziele sind vor allem Pflanzenschutz und zum anderen eine Qualitäts- und Ertragssteigerung der erzielbaren Produkte.

Zahlreiche Verfahren zur genetischen Modifikation dikotyler und monokotyler Pflanzen sind bekannt (vgl. u.a. Gasser und Fraley, *Science* 244 (1989), 1293-1299; Potrykus, *Ann. Rev. Plant Mol. Biol. Plant Physiol.* 42 (1991), 205-225). Oft basieren diese auf der Übertragung von Genkonstrukten, die in den meisten Fällen Kombinationen von bestimmten codierenden Regionen von Strukturgenen mit Promotorregionen derselben oder anderer Strukturgene, sowie Transkriptionsterminatoren darstellen.

Die Bereitstellung von Promotoren ist im Zusammenhang mit der Expression von Strukturgenen von großer Bedeutung für die Herstellung von transgenen Pflanzen, da die Spezifität eines Promotors ausschlaggebend dafür ist, zu welchem Zeitpunkt, in welchen Gewebeotypen unter welchen physiologischen Bedingungen und mit welcher Intensität ein transferiertes Gen in der modifizierten Pflanze exprimiert wird.

- Die Initiation und Regulation der Transkription unterliegt dem als Promotor bezeichneten DNA-Abschnitt eines Gens. In der Regel liegen Promotorsequenzen im 5'-flankierenden Bereich eines transkribierten Gens. Einzelne Elemente eines Promotors (z.B. transkriptionelle Enhancer) können unter Umständen auch im 3'-flankierenden Bereich oder innerhalb von Intron-Sequenzen eines Gens lokalisiert sein (Kuhlemeier (1992) *Plant Mol. Biol.* 19: 1-14; Luehrs (1994) *The Maize Handbook*, 636-638).
- 15 Eine Vielzahl von Promotoren, die die Expression von transferierten Genen oder Strukturgenen in Pflanzen steuern können, ist bereits bekannt. Der am häufigsten verwendete Promotor ist der 35S CaMV-Promotor (Franck et al., *Cell* 1 (1980), 285-294), der zu einer konstitutiven Expression des eingesetzten Gens führt. Häufig werden auch induzierbare Promotoren eingesetzt, beispielsweise zur Wundinduktion (DE-A-3843628), chemischen Induktion (Ward et al., *Plant Molec. Biol.* 22 (1993), 361-366) oder Lichtinduktion (Fluhr et al., *Science* 232 (1986), 1106-1112).
- Auch die Verwendung zell- und gewebebespezifischer Promotoren wurde beschrieben:
- 25 schließzellenspezifische (DE-A-4207358), samen-, knollen- und fruchtspezifische (zusammengefaßt in Edwards and Coruzzi, *Annu. Rev. Genet.* 24 (1990), 275-303; DE-A-3843627), phloemspezifische (Schmülling et al., *Plant Cell* 1 (1989), 665-670), wurzelknöllchenspezifische (DE-A-3702497) oder meristemspezifische Genexpression (Ito et al., *Plant Mol. Biol.* 24 (1994), 863-878).

Die Verwendung der beschriebenen Promotoren ist oft mit Nachteilen verbunden.

Promotoren, die eine konstitutive Expression der von ihnen kontrollierten Gene bewirken, können beispielsweise zur Erzeugung herbizidtoleranter und pathogenresistenter Pflanzen eingesetzt werden, haben aber den Nachteil, dass die Produkte der von ihnen kontrollierten Gene in allen Teilen der Pflanze vorliegen, was unerwünscht sein kann, z.B. wenn die Pflanzen der Ernährung dienen sollen. Ein negativer Aspekt der gewebe- und/oder entwicklungsunabhängigen Expression eines Transgens kann außerdem in einer unerwünschten Wirkung auf die Pflanzenentwicklung bestehen. Induzierbare Promotoren sind gleichfalls mit

10 Nachteilen verbunden, da die Induktionsbedingungen bei landwirtschaftlich genutzten Pflanzen im Freiland typischerweise schwer kontrollierbar sind.

Darüberhinaus ist es zur Bewältigung verschiedener Ansätze der genetischen Veränderung von Pflanzen erforderlich, Gene, die unterschiedlich reguliert werden sollen, unter die Kontrolle verschiedener Promotoren zu stellen. Es ist daher notwendig, verschiedene Promotorsysteme mit unterschiedlicher Spezifität zur Verfügung zu stellen.

- Die kontrollierte Expression von Transgenen ist zum Beispiel für das Einbringen von 20 Resistenzenschaften oder die Modifikation von Stoffwechselvorgängen in Pflanzen von großem Nutzen. Soll ein Transgen in definierte Stoffwechselwege einer Pflanze eingreifen, z.B. einen neuen Inhaltstoff produzieren oder vor Pathogenbefall schützen, ist seine räumliche und/oder zeitlich kontrollierte Expression nur unter Verwendung eines induzierbaren und/oder gewebe- und/oder entwicklungsspezifischen Promoters möglich. Erst dadurch wird die gezielte Produktion von erwünschten Inhaltsstoffen in einem definierten Entwicklungsstadium oder Gewebe der Pflanze ermöglicht. Z. B. kann für die Anwendung der Antisense-Technologie, in der die Expression von pflanzenbezogenen Genen verhindert werden soll, der Einsatz von gewebe- und/oder entwicklungsspezifischen Promotoren gegenüber einer gewebe- und/oder entwicklungsunabhängigen Expression von

Vorteil sein: Der Antisense-Effekt tritt so genau in dem Entwicklungsstadium bzw. Gewebe der Pflanze auf, in dem auch das pflanzenbezogene Gen exprimiert wird.

- 5 Promotoren, die die Geneexpression in der Karyopse regulieren sind bisher nur in begrenzter Zahl bekannt. Zur Bewältigung bestimmter Ansätze der genetischen Veränderung von Pflanzen ist es erforderlich, alternative Promotorsysteme zur Genexpression in der Karyopse zur Verfügung zu stellen, die im Vergleich zu den bekannten Systemen unterschiedlich reguliert sind.
- 10 Aus verschiedenen Pflanzenspezies wurden Gene der Stärkebiosynthese isoliert, deren Genprodukte spezifisch im Speichergergewebe der Karyopse, nicht aber in vegetativen Geweben exprimiert werden, z.B. entsprechende Gene bzw. cDNA-Klonen der GBSS I. Dazu gehört der waxy Locus aus Mais (Khosla *et al.* (1986) Mol. Gen. Genet. 203: 237-244), sowie aus Gerste (Rohde *et al.* (1988) Nucleic Acid Research 16, No. 14: 7185-7186), Reis (Wang *et al.* (1990) Nucleic Acid Research 18: 5698), Kartoffel (van der Leij *et al.* (1991) Mol. Gen. Genet. 228: 240-248), Erbsen (Dry *et al.* (1992) Plant J. 2: 193-202), Mais (Salehuzzaman *et al.* (1993) Plant Mol. Biol. 20: 947-962), Hirse (Hsingh *et al.* (1995) Acc.Nr. U23954) und Zuckerrübe (Schneider *et al.* (1999) Mol. Gen. Genet. 262: 51-524).
- 15 Auch aus Weizen wurde bereits eine waxy-cDNA isoliert und sequenziert (Clark *et al.* (1991) Plant Mol. Biol. 16: 1099-1101; Ainsworth *et al.* (1993) Plant Mol. Biol. 22: 67-82). Ein weiterer Klon der GBSS I wurde aus einer cDNA-Bank von ca. 20 Tage alten Weizenkaryopsen isoliert (Block (1997) "Isolation, Charakterisierung und 25 Expressionsanalysen von Stärkesynthase-Genen aus Weizen" (*Triticum aestivum* L.), Dissertation, Universität Hamburg).
- Während inzwischen drei homologe waxy Strukturgene, die auf den Chromosomen 7A, 4A und 7D des hexaploiden Weizens liegen, isoliert wurden (Murai *et al.* (1999) 30 Gene 234: 71-79), sind die Promotorsequenzen dieser oder anderer genomischer Klone aus Weizen bisher unbekannt. Bekannt sind lediglich die 5'-flankierenden

Bereiche der GBSS I aus Gerste (GenBank Acc.No. X07931), Löwenmäulchen (GenBank Acc.No. AJ006294), Reis (GenBank Acc.No. AB008794; AB008795), Kartoffel (GenBank Acc.No. X58453) und Mais (GenBank Acc.No. X03835).

- Analysen wurde jeder der drei Klone einem Genom des hexaploiden Weizens zugeordnet. In Western-Blot Analysen konnte gezeigt werden, daß das 100kDa Protein (SGP-B1) in frühen Stadien der Endospermentwicklung sowohl stärkegebunden, als auch in löslichen Form vorliegt.
- 5 Ein cDNA-Klon einer stärkegebundenen Stärkesynthase vom Typ II (GBSS II), die nicht im Endosperm, sondern nur in Blättern und im Perikarp von Weizen exprimiert wird, konnte kürzlich isoliert werden (Vrinten & Nakamura (2000) Plant Physiol. 122: 255-263). In diploidem Weizen (*Triticum monococcum* L.) wurde außerdem auf Proteinebene eine 56kDa große Isoform einer GBSS beschrieben (Fujita & Taira (1998) Planta 207: 125-132). Diese Isoform kann im Perikarp, Aleuron und Embryo von unreifen Karyopsen nachgewiesen werden.
- Darüber hinaus sind neben der GBSS I-Gene auch codierende Sequenzen einer Stärkesynthase des Typ II aus einer karyopsenspezifischen cDNA-Bank isoliert worden (Walter et al. (1997), WO 97/45545, EMBL Datenbank U66377), deren karyopsenspezifische Expression nachgewiesen wurde (Walter et al. (1989) Analysis of starch synthase II from wheat; In: Genetic Tailoring of Novel Starch Polymers, 16.-20. September 1989, Cergy-le-Rouet, Frankreich). In Northern-Analysen wurde gezeigt, daß die Transkripte der GBSS I (Block (1997) Dissertation, Universität Hamburg) und der SS II (Walter et al., in Vorbereitung) in frühen Entwicklungsstadien der Karyopse, aber nicht im assimilierenden Blattgewebe auftreten.
- Weitere cDNA-Sequenzen von Stärkesynthasen des Typ II wurden außerdem aus Mais (zSSIIa und zSSIIb; Ham et al. (1998) Plant Mol. Biol. 37: 639-649), Erbsen (Dry et al. (1992) Plant J. 2: 193-202); Kartoffel (Edwards et al. (1995) Plant J. 8: 283-294) und Süßkartoffel (Ham et al. (1998) Acc. Nr. AF068834) isoliert.
- Drei cDNA-Sequenzen der SS II aus Weizen (*T. aestivum* cv "Chinese Spring"; wSSII-A1, wSSII-B1, wSSII-D1) wurden ferner aus einer endospemspezifischen cDNA-Bank isoliert (Li et al., (1999) Plant Phys. 120: 1147-1155), Mittels PCR-
- 5 Der vorliegenden Erfundung liegt somit die Aufgabe zugrunde, Mittel bereitzustellen, die eine gezielte karyopsenspezifische Genexpression in genetisch modifizierten Pflanzen ermöglichen, vorzugsweise in monokotylen Pflanzen.
- 10 Durch den Einsatz der erfundungsgemäßigen Mittel wird ein gewebe- und/oder entwicklungsspezifisch definierter Eingriff z.B. in die Biosynthese von Speicherstärke oder die Nutzung der Karyopse als Speicher- oder Syntheseorgan für andere Reservestoffe als Stärke (z.B. biologische Kunststoffe) ermöglicht.
- 15 Unter der Kontrolle der erfundungsgemäßigen Promotortsequenzen können somit Gene während der Entwicklung von Getreidean spezifisch und zu einem frühen Zeitpunkt in der Karyopse exprimiert werden.
- Die erfundungsgemäßigen Promotoren ermöglichen so beispielsweise gezielte Veränderungen in der Speicherstärke: Um eine möglichst vielfältige Anwendung von Stärke für die unterschiedlichsten industriellen Bedürfnisse zu ermöglichen, ist es wünschenswert Pflanzen bereitzustellen, die Stärken mit definierten Eigenschaften synthetisieren können. So werden z.B. für die verarbeitende Industrie entscheidende Eigenschaften wie Löslichkeit, Verkleisterungsverhalten, Retrogradierungstendenz, Viskosität und Komplexiervermögen durch das Verhältnis von Amylose und Amylopektin zueinander, dem Verzweigungsgrad des Amylopektins und die Derivatisierung der Polymere bestimmt. Eine gezielte Modifizierung solcher Eigenschaften erfordert aufwendige Verfahren zur Trennung von Amylose und Amylopektin oder die kostspielige chemische Modifizierung von Stärke.
- 20 25 30

Eine begrenzte Möglichkeit, solche Pflanzen zu erhalten, besteht in der Anwendung klassischer Züchtungsmethoden. Durch Kreuzung spontan auftretender Mutanten gelang so zum Beispiel die Herstellung eines (amylosefreien) "waxy" Weizens (Nakamura et al. (1995) Mol. Gen. Genet. 248: 253-259). Aufgrund des polyploiden Charakters des kommerziell bedeutenden Brot-Weizens sind Mutationen welche die Stärkestruktur betreffen nicht leicht zu erkennen, da sie von intakten Allelen kompensiert werden. Die Anwendung klassischer Züchtungsmethoden erweist sich daher als schwierig. Außerdem kann nur auf bereits vorhandene Enzymaktivitäten zurückgegriffen werden. Neue Aktivitäten, die bisher nicht in Pflanzen identifiziert wurden oder die in Pflanzen (oder anderen Organismen) identifiziert wurden, die nicht mit der Zielpflanze kreuzbar sind, können ebenfalls nicht mit Hilfe züchterischer Verfahren bearbeitet werden.

Eine Alternative besteht in der gezielten Modifikation stärkeproduzierender Pflanzen durch gentechnische Methoden. Voraussetzung hierfür ist jedoch neben der Identifizierung und Isolierung von Genen, deren Genprodukte an der Stärkesynthese und/oder Stärkemodifikation beteiligt sind, der Einsatz spezifischer Promotoren, die eine gewebe- und/oder entwicklungsspezifische Expression der von ihnen kontrollierten Gene in den stärkebildenden Geweben vermitteln.

Durch den Einsatz der erfindungsgemäßen Promotorsequenzen könnten außerdem auch solche Gene eingebracht werden, die dem Getreideendosperm eine modifizierte Funktion als Speichergewebe für andere Speicherstoffe verleihen.

Diese Aufgaben werden erfindungsgemäß durch die Bereitstellung der in den Patentansprüchen charakterisierten Ausführungsformen gelöst.

Es wurde nun gefunden, daß überraschenderweise ein Promotor wie nachfolgend definiert in Pflanzen eine karyopsenspezifische Expression einer von ihm kontrollierten codierenden Nukleotidsequenz bewirkt.

- Somit betrifft die vorliegende Erfindung ein Nukleinsäuremolekül mit der Funktion eines karyopsenspezifischen Promotors, das
- ein oder mehrere Sequenzelemente umfaßt, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus den Nukleotiden 1736-1764 der Seq ID No. 1; 1885-1906 der Seq ID No. 1; 1937-2011 der Seq ID No. 1; 2115-2140 der Seq ID No. 1; 2306-2319 der Seq ID No. 1; 2940-2963 der Seq ID No. 1 und 3012-3029 der Seq ID No. 1;
 - die durch Seq ID No. 1 oder SEQ ID No. 2 definierte bzw. durch DSM 13398 (Plasmid p 11/1) oder DSM 13397 (Plasmid p 8/C) hinterlegte Nukleinsäuresequenz umfaßt;
 - einen funktionalen Teil einer der in b) genannten Nukleinsäuresequenz umfaßt;
 - eine Sequenz umfaßt, die mit mindestens einer der in b) genannten Nukleinsäuresequenzen hybridisiert; und/oder
 - eine Sequenz umfaßt, die mit einer der in b) genannten Nukleinsäuresequenzen zu mindestens 60 %, vorzugsweise zu mindestens 75 %, insbesondere zu mindestens 90 % und ganz besonders bevorzugt zu mindestens 95% identisch ist.
- Im Rahmen der vorliegenden Erfindung werden die Begriffe „erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül“ und „erfindungsgemäßer Promotor“ als Synonyme verwendet. In einer bevorzugten Ausführungsform sind die erfindungsgemäßen Promotoren solche von pflanzlichen Genen, vorzugsweise monokotyler Pflanzen, oder von solchen abgeleitet. In einer weiteren, bevorzugten Ausführungsform sind die erfindungsgemäßen Promotoren zur Expression im monokotylen Pflanzen und/oder zur Expression von Stärkesynthase-Genen geeignet. Die erfindungsgemäßen Promotoren können hierbei aus pflanzlichen Genen stammen, durch rekombinante DNA-Techniken modifiziert sein und/oder synthetisch hergestellt werden.
 - Die erfindungsgemäßigen Promotoren können z.B. modifiziert werden, indem sie mit anderen cis-regulatorischen Elementen kombiniert werden. So können die

Promotoren zusätzlich mit anderen Enhancer-Elementen kombiniert werden, um die Expression des korrespondierenden Nucleinsäuremoleküls zu verstärken, ohne seine gewebspezifische Expression zu beeinflussen. Auch individuelle cis-Elemente der isolierten Promotoren können ebenfalls zu regulatorischen Einheiten miteinander kombiniert werden.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter einem "Promotor" eine DNA-Sequenz verstanden, die den regulatorischen Anteil eines Gens, vorzugsweise eines Strukturgens, umfaßt. Unter dem "regulatorischen Anteil" eines Gens wird derjenige Anteil verstanden, der die Expressionsbedingungen des Gens bestimmt. Ein regulatorischer Anteil besitzt ein Sequenzmotiv, an dem Transkriptionsfaktoren und RNA-Polymerase assemblieren und die Transkription des codierenden Anteils des Gens einleiten. Darüber hinaus kann der regulatorische Anteil ein oder mehrere positive regulatorische Elemente, sogenannte Enhancer umfassen. Er kann zusätzlich oder an deren Stelle aber auch negativ regulatorische Elemente, sogenannte Silencer enthalten. Unter einem "Strukturgen" wird im allgemeinen eine genetische Einheit aus regulatorischem und codierendem Anteil verstanden, deren Genprodukt im allgemeinen ein Protein ist. Die Information für die primäre Aminosäuresequenz des Genprodukts ist im codierenden Anteil des Strukturgens enthalten, während der regulatorische Anteil bestimmt, wann, in welchen Geweben, unter welchen physiologischen Bedingungen und in welchen Mengen das Transkript des codierenden Anteils gebildet wird, nach dessen Vorlage das Genprodukt synthetisiert wird.

Unter dem Begriff "Karyopsenspezifisch" versteht man im Rahmen der vorliegenden Erfindung, daß ein unter der Kontrolle eines erfindungsgemäßigen Promotors stehendes Gen in der Karyopse exprimiert wird, vorzugsweise zu einem frühen Zeitpunkt, d.h. < 15 dap (dap = Tage nach der Befruchtung), vorzugsweise < 10 dap, insbesondere etwa 5 dap. Insbesondere ist Karyopsenspezifität im Rahmen der vorliegenden Erfindung dann gegeben, wenn der erfindungsgemäßige Promoter die Expression eines Gens in der Karyopse im Vergleich zu anderen Geweben wie z.B.

maturen Blättern oder Wurzeln begünstigt und in der Karyopse eine signifikante Erhöhung, d.h. mindestens 2- bis 5-fache, vorzugsweise 5- bis 10-fache, insbesondere 10- bis 100fache oder höhere Expression bewirkt.

- 5 Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung kann Karyopsenspezifität z.B. durch übliche Reportergen-Experimente analysiert werden. Zur Testung einer isolierten Promotorsequenz auf deren Promotoraktivität in Karyopse kann der Promotor beispielsweise in einer Expressionskassette bzw. in einem Vektor zur Pflanzentransformation operativ mit einem Reportergen, wie z.B. dem β-Glucuronidasegen aus *E. coli*, verknüpft werden. Dieses Konstrukt wird dann zur Transformation von Pflanzen verwendet. Anschließend wird die Expression der β-Glucuronidase in der Karyopse im Vergleich zu anderen Geweben, wie z.B. maturen Blättern oder Wurzeln bestimmt, wie z.B. bei Martin et al. (The GUS Reporter System as a Tool to Study Plant Gene Expression, In: GUS Protocols: Using the GUS Gene as a Reporter of Gene Expression, Academic Press (1992), 23-43) beschrieben.
- 10 Der Begriff "Karyopse" ist dem Fachmann geläufig und umfaßt insbesondere Perikarp und Endosperm. Da diese Gewebe eine dynamische Entwicklung durchlaufen, korreliert z.B. die Entwicklung des Endosperms in verschiedenen Zell- oder Gewebetypen mit unterschiedlichen biochemischen Aktivitäten, bedingt durch eine differenzielle Genexpression. Ergänzend sei auf Strasburger verwiesen (Lehrbuch der Botanik für Hochschulen: Begr. v. Eduard Strasburger u. a. Neubearb. v. Peter Sittig, Hubert Ziegler u. a., 34. Aufl., 1998, Fischer (Gustav-Niemeyer Verlag, Stuttgart).
- 15 Der erfindungsgemäßige Promotor erlaubt eine karyopsenspezifische Genexpression einer von ihm kontrollierten codierenden Nucleotidssequenz. Er stellt eine interessante Alternative zu bekannten Promotoren dar, weil er auch die Genexpression im Perikarp vermitteln kann und darüber hinaus bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt in der Karyopse aktiv ist, d.h. < 15 dap, vorzugsweise < 10

dap. insbesondere etwa 5 dap. Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Promotors kann insbesondere die Expression von solchen Genen effektiv gesteuert werden, deren Genprodukte am Stärkemetabolismus in monokotylen Pflanzen und insbesondere Weizen beteiligt sind.

5 Vielfältige Verwendungsmöglichkeiten stehen für die erfindungsgemäßen Promotoren zur Verfügung. Beispielsweise wird die Herstellung transgener Pflanzen ermöglicht, die aufgrund eines modifzierten Metabolismus in der Karyopse eine qualitativ und/oder quantitativ veränderte Speicherstoffzusammensetzung in ihrem Speichergewebe, d.h. im Getreidekorn aufweisen.

- 10 Neben einem Promotor, der die gesamte durch SEQ ID No. 1 oder SEQ ID No. 2 definierte Sequenz, bzw. die entsprechend durch DSM 13398 oder DSM 13397 hinterlegte Sequenz aufweist, betrifft die vorliegende Erfindung auch Promotoren, die einen funktionalen Teil dieser Sequenz aufweisen und die in Pflanzen eine karyopsenspezifische Expression einer von ihnen kontrollierten codierenden Nukleotidsequenz bewirken.
- Unter einem "funktionalen Teil" versteht man im Rahmen der vorliegenden Erfindung solche Sequenzen, welche nicht die vollständige Sequenzen der besagten Promotoren, wie durch SEQ ID No. 1 oder SEQ ID No. 2 definiert, bzw. durch DSM 13398 oder DSM 13397 hinterlegt, umfassen und trotz dieser Abweichung die erfindungsgemäße Karyopsenspezifität besitzen.

- 20 Ein Maß für die Promotoraktivität ist beispielsweise die für ein bestimmtes Markergen, das unter der regulativen Kontrolle des erfindungsgemäßen Promotors steht, ermittelte Expressionsrate. Beispiele für geeignete Markergene sind das β -Glucuronidase-(GUS)-Gen aus *E. coli* (Jefferson (1987) Plant Molecular Biology Reporter Vol. 5 (4): 387-405) oder das Green-Fluorescence-Protein-(GFP)-Gen (Baulcombe et al., Plant J. 7 (16) (1993), 1045-1053). Die Organ- bzw. Gewabespezifität lässt sich leicht durch Vergleich der an einzelnen Geweben bzw.

Organen der Pflanze ermittelten Expressionsraten für besagte Markergene bestimmen. Funktionale Teile der Promotorsequenzen umfassen im Rahmen der vorliegenden Erfindung sowohl natürlich vorkommende Varianten der erfindungsgemäßen Sequenzen, als auch künstliche, z.B. durch chemische Synthese erhaltene Nukleotidsequenzen.

- Unter einem funktionalen Teil werden insbesondere auch natürliche oder künstliche Mutationen einer ursprünglich isolierten Promotorsequenz verstanden, welche die erfindungsgemäßen Merkmale und physiologischen Funktionen zeigen. Der Begriff „Mutationen“ umfasst hierbei Substitutionen, Additionen, Deletionen, Vertauschungen und/oder Insertionen eines oder mehrerer Nukleotide, insbesondere von geeigneten cis-Elementen. Somit werden beispielsweise auch solche Nukleotidsequenzen durch die vorliegende Erfindung mit umfaßt, welche man durch Modifikation der durch Seq ID No. 1 oder SEQ ID No. 2 definierten bzw. 10 der durch DSM 13397 oder DSM 13398 hinterlegten Promotorsequenzen erhalten kann. Ziel einer solchen Modifikation kann z.B. die Herstellung von Fragmenten oder die Einfügung oder Umstellung von bekannten Nukleotid-Motiven wie z.B. von Restriktionschnittstellen oder cis-Elementen sein.
- 20 Funktionale Teile der erfindungsgemäßen Promotorsequenz umfassen dabei auch solche Promotorvarianten, deren Promotoraktivität, verglichen mit dem unmodifizierten Promotor (Wildtyp), abgeschwächt oder verstärkt ist.
- Insbesondere werden unter funktionalen Teilen der erfindungsgemäßen 25 Promotorsequenzen die durch Deletionsanalyse (vgl. Beispielteil) identifizierten Bereiche verstanden, wie z.B. die Bereiche 1241-3103; 1515-3103; 1827-3103 und 2186-3103 der Seq ID No. 1 sowie die Bereiche 1331-2445 und 1834-2445 der Seq ID No. 2.
- 30 Prinzipiell wird die Aktivität eines eukaryontischen RNA-Polymerase II-Promotors durch das synergistische Zusammenwirken verschiedener trans-aktiver Faktoren

- (DNA-bindende Moleküle wie Proteine oder Hormone) bedingt, welche an die verschiedenen im Promotor vorhandenen *cis*-regulatorischen DNA-Elemente, in der Regel etwa 10-20 Nukleotide lange DNA-Bereiche binden. Diese Faktoren wechselwirken direkt oder indirekt mit einzelnen oder mehreren Faktoren der basalen Transkriptionsmaschinerie, was letztlich zur Ausbildung eines Präinitiationskomplexes in der Nähe der Transkriptionsstartstelle führt (Drapkin et al., Current Opinion in Cell Biology 5 (1993), 469-476). Man kann von einem modularen Aufbau eukaryotischer RNA-Polymerase II-Promotoren ausgehen, wobei die *cis*-Elemente (Module) als Teilkomponenten des Promotors dessen Aktivität im einzelnen determinieren (Tjian und Maniatis, Cell 77 (1994), 5-8).

- In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung daher insbesondere auch Di- und Multimere von Subdomänen bzw. *cis*-Elementen der unter SEQ ID No.1 oder SEQ ID No. 2 definierten Nucleotidsequenzen.
- 5 In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung wird die Erhöhung der Promotoraktivität im Vergleich zum Wildtyp durch die Kombination des erfindungsgemäßigen Promotors mit einem sogenannten Enhancer erreicht. In der Literatur sind verschiedene Enhancer beschrieben worden, die in der Regel eine gewebespezifische Erhöhung der Expression bewirken, wobei die Gewebespezifität im allgemeinen durch den jeweils verwendeten Enhancer determiniert wird (Bentley et al., Science 250 (1990), 959-966; Bentley et al., EMBO J. 8 (1989), 2195-2202; Chen et al., EMBO J. 7, (1988), 297-302; Simpson et al., Nature 323 (1986), 551-554).
- 10 15 Darüberhinaus gibt es auch Enhancer, wie z.B. den P_EE Enhancer (Sandhu et al., Plant Mol. Biol. 37 (1998), 885-896), die nicht gewebespezifisch wirken und somit als quantitative Verstärkerelemente vor den erfindungsgemäßigen Promotor gesetzt werden können, um die Expression in der Karyopse zu erhöhen, ohne die Qualität der Gewebespezifität des erfindungsgemäßigen Promotors zu verändern. Ferner können auch synthetische Enhancer verwendet werden, die beispielsweise von natürlich vorkommenden Enhancern abgeleitet sind und/oder durch Kombination verschiedener Enhancer erhalten werden.
- 20 25 Ebenso betrifft die vorliegende Erfindung auch Promotoren, die eine Nucleotidsequenz aufweisen, die mit der durch SEQ ID No. 1 oder SEQ ID No. 2 definierten bzw. durch DSM 13398 oder DSM 13397 hinterlegten Nucleotidsequenz hybridisieren, vorzugsweise unter stringenten Bedingungen und die in Pflanzen eine erfolgen.
- 30 Des Weiteren können solche Subdomänen bzw. *cis*-Elemente, das erfindungsgemäßigen Promotors auch über Deletionsanalysen bzw. Mutagenesen identifiziert werden (Kawagoe et al., Plant J. 5(6) (1994), 885-890). Der Test auf Funktionalität einer solchen Subdomäne oder *cis*-Elements des Promotors kann *in planta* durch den Nachweis der Reportergenaktivität in transformierten Zellen erfolgen.

- Der Ausdruck "stringente Bedingungen" bedeutet dabei beispielsweise Hybridisierungsbedingungen, wie sie in Sambrook et al. (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. Aufl. (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) beschrieben sind. Insbesondere findet eine stringente Hybridisierung unter den folgenden Bedingungen statt:
- Hybridisierungspuffer: 2x SSC; 10x Denhardt's Lösung (Fikoll 400 + PEG + BSA; Verhältnis 1:1); 0.1% SDS; 5 mM EDTA; 50 mM Na₂HPO₄; 250 µg/ml Herringssperma-DNA; 50 µg/ml tRNA; oder 0.25 M Natriumphosphatpuffer pH 7.2, 1 mM EDTA, 7% SDS
- Hybridisierungstemperatur T = 65 bis 68 °C;
- Waschpuffer 0.2 x SSC; 0.1% SDS;
- Waschtemperatur T = 65 bis 68 °C.
- Varzugsweise weisen derartige Promotoren eine Sequenzidentität von mindestens 30%, bevorzugt von mindestens 40%, bevorzugt von mindestens 50%, besonders bevorzugt mindestens 60%, insbesondere bevorzugt von mindestens 70% und vorzuhaltene von mindestens 80%, vorzugsweise mindestens 90% und insbesondere bevorzugt mindestens 95% zu der unter Seq ID No. 1 oder 2 gezeigten Promotorsequenz oder Teilen davon auf. Vorzugsweise wird die Sequenzidentität derartiger Promotorsequenzen durch Vergleich mit der unter SEQ ID No. 1 oder SEQ ID No. 2 dargestellten Nucleotidsequenz bestimmt. Wenn zwei zu vergleichende Sequenzen eine unterschiedliche Länge aufweisen, bezieht sich die Sequenzidentität vorzugsweise auf den prozentualen Anteil der Nucleotidreste der kürzeren Sequenz, die identisch sind mit den Nucleotidresten der längeren Sequenz. Die Sequenzidentität kann üblicherweise durch Verwendung von Computerprogrammen wie z. B. das Bestfit-Programm (Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive Madison, WI 53711) bestimmt werden. Bestfit nutzt den lokalen Homologiealgorithmus von Smith und Waterman, Advances in Applied Mathematics 2 (1981), 482-489, um das Segment mit höchster

- Sequenzidentität zwischen zwei Sequenzen zu finden. Bei der Anwendung von Bestfit oder einem anderen Sequenz-Alignment-Programm zur Bestimmung, ob eine bestimmte Sequenz beispielsweise zu 95% identisch ist mit einer Referenzsequenz der vorliegenden Erfindung, werden die Parameter vorzugsweise so eingestellt, daß 5 der Prozentanteil der Identität über die gesamte Länge der Referenzsequenz berechnet wird und daß Homologielücken ("gaps") von bis zu 5% der Gesamtzahl der Nukleotide in der Referenzsequenz erlaubt sind. Bei der Verwendung von Bestfit können die sogenannten optionalen Parameter bei Ihren voreingestellten ("default") Werten belassen werden. Die Abweichungen, die bei dem Vergleich einer 10 gegebenen Sequenz mit den oben beschriebenen Sequenzen der Erfindung auftreten, können beispielsweise durch Addition, Deletion, Substitution, Insertion oder Rekombination verursacht sein. Promotorsequenzen, die wie oben beschrieben mit der durch SEQ ID No. 1 oder SEQ ID No. 2 definierten bzw. durch DSM 13398 oder DSM 13397 hinterlegten Nucleotidsequenz hybridisieren, stammen 15 vorzugsweise aus pflanzlichen Organismen, bevorzugt aus höheren Pflanzen, besonders bevorzugt aus monokotylen Pflanzen, insbesondere bevorzugt aus Gramineen und ganz besonders Pflanzen der Gattung *Triticum*.
- Ferner betrifft die vorliegende Erfindung auch Promotoren, die einen funktionalen 20 Teil dieser Sequenzen aufweisen und die in Pflanzen eine Karyopsenspezifische Expression einer von ihnen kontrollierten codierenden Nucleotidsequenz bewirken.
- In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung weist der erfundungsgemäßige Promotor die gesamte oder einen funktionalen Teil der durch 25 SEQ ID No. 1 oder SEQ ID No. 2 definierten bzw. durch DSM 13398 oder DSM 13397 hinterlegten Nucleotidsequenz auf, insbesondere Deletionsmutanten, die die Nukleotide 1241-3103; 1515-3103; 1827-3103 und 2186-3103 aus der Seq ID No. 1 sowie die Nukleotide 1331-2445 und 1834-2445 aus der Seq ID No. 2 umfassen.
- Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin Expressionskassetten enthaltend einen 30 erfundungsgemäßigen Promotor. Unter dem Begriff "Expressionskassette" wird dabei

die Kombination eines erfindungsgemäßen Promotors mit einer zu exprimierenden Nucleinsäuresequenz verstanden. Diese Nucleinsäuresequenz kann beispielsweise eine ein Polypeptid codierende Sequenz sein, z.B. ein Gen, das in sense- oder in antisense-Orientierung mit dem Promotor verknüpft sein kann. Die

5 Nucleinsäuresequenz kann auch eine nicht-translatierbare RNA, beispielsweise eine antisense-RNA oder ein Ribozym, codieren. Diese Nucleinsäuresequenzen können in Verbindung mit dem erfindungsgemäßen Promotor benutzt werden, um Pflanzen mit verändertem Phänotyp herzustellen.

- 10 Die erfindungsgemäßen Expressionskassetten können weiterhin eine Transkriptionsterminationssequenz stromabwärts des 3'-Endes der mit dem Promotor verknüpften Nucleinsäuresequenz enthalten. Unter einer "Transkriptionssequenz" wird dabei eine DNA-Sequenz verstanden, die am 3'-Ende eines codierenden Genabschnitts lokalisiert ist und in der Lage ist, die Beendigung
- 15 der Transkription und gegebenenfalls die Synthese eines Poly-A-Schwanzes hervorzurufen. Ein Beispiel für eine solche Terminationssequenz ist die des Octopinsynthasegens. Weitere sind dem Fachmann gut bekannt.
- 20 Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung Vektoren, die mindestens einen erfindungsgemäßen Promotor enthalten.

In einer weiterhin bevorzugten Ausführungsform ist der erfindungsgemäße Promotor in einem derartigen Vektor verknüpft mit Restriktionsschnittstellen bzw. einem Polylinker, die eine Integration beliebiger Sequenzen stromabwärts des Promotors erlauben. Dabei wird unter einem "Polylinker" eine DNA-Sequenz verstanden, die Erkennungssequenzen von mindestens einem Restriktionsenzym, vorzugsweise von zwei oder mehr Restriktionsenzymen, enthält.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform enthält ein erfindungsgemäßer Vektor auch noch eine Sequenz für die Termination der Transkription,

beispielsweise die des Octopinsynthasegens, stromabwärts des Promotors bzw. des Polylinkers.

- 5 Ebenso betrifft die vorliegende Erfindung Vektoren, die erfindungsgemäßen Expressionskassetten enthalten. Gegebenenfalls enthalten die erfindungsgemäßen Vektoren Selektionsmarker, die geeignet sind, Zellen, die die erfindungsgemäßen Vektoren enthalten, zu identifizieren und gegebenenfalls zu selektionieren.
- 10 In einer bevorzugten Ausführungsform sind die erfindungsgemäßen Vektoren geeignet zur Transformation von pflanzlichen Zellen und besonders bevorzugt zur Integration von Fremd-DNA (z.B. Transgenen) in das pflanzliche Genom. Ein Beispiel für derartige Vektoren sind binäre Vektoren, die zum Teil auch bereits kommerziell erhältlich sind.
- 15 Ferner betrifft die vorliegende Erfindung Wirtszellen, die mit einem erfindungsgemäßen Nukleinsäuremolekül (d.h. erfindungsgemäßen Promotor), einer erfindungsgemäßen Expressionskassette oder einem erfindungsgemäßen Vektor genetisch modifiziert sind, insbesondere pflanzliche Zellen oder mikrobielle Zellen, z. B. der Gattung Agrobacterium.
- 20 "Genetisch modifiziert" bedeutet dabei, daß die Wirtszelle einen erfindungsgemäßen Promotor, eine erfindungsgemäße Expressionskassette oder einen erfindungsgemäßen Vektor enthält, vorzugsweise stabil ins Genom integriert, und der Promotor bzw. die Expressionskassette entweder in die Wirtszelle oder in einem Vorgänger dieser Zelle als Fremd-DNA eingebracht wurde. D.h. die erfindungsgemäßen Zellen können entweder selbst das unmittelbare Produkt eines Transformationsereignisses sein oder davon abstammende Zellen, die einen erfindungsgemäßen Promotor oder eine erfindungsgemäße Expressionskassette enthalten. Als Wirtszellen kommen sowohl prokaryontische, insbesondere
- 25 Bakterien, als auch eukaryontische Zellen in Frage. Eukaryontische Zellen können beispielsweise Pilzzellen sein, insbesondere der Gattung *Saccharomyces*.
- 30

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung die Verwendung von erfindungsgemäßigen Vektoren, erfindungsgemäßigen Expressionskassetten oder erfindungsgemäßigen Wirtszellen zur Herstellung transgener Wirtszellen, insbesondere Pflanzenzellen und Pflanzen.

5 geweben oder -teilen, insbesondere der Gattung *Agrobacterium*.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform sind die erfindungsgemäßigen Wirtszellen Pflanzenzellen, die im folgenden als transgene Pflanzenzellen bezeichnet werden.

- 10 Ferner betrifft die vorliegende Erfindung auch Pflanzen, die erfindungsgemäßige Pflanzenzellen enthalten. Diese können jeder beliebigen Pflanzengattung, -familie, -ordnung bzw. -klasse angehören. Es können sowohl monokotyle als auch dikotyle Pflanzen sein. Vorzugsweise sind die erfindungsgemäßigen Pflanzen Nutzpflanzen, d.h. Pflanzen, die für den Menschen von agrarwirtschaftlichem, forstwirtschaftlichem und/oder gartenbauwirtschaftlichem Interesse sind. Bevorzugt sind dabei landwirtschaftliche Nutzpflanzen, insbesondere Getreidearten wie z.B. Weizen, Hafer, Gerste, Roggen, Mais, Reis oder Futter- und Weidegräser (wie z.B. Alfalfa, weißer oder roter Klee).
- 15 In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung auch Verfahren zur Herstellung von transgenen Pflanzenzellen und Pflanzen, dadurch gekennzeichnet, daß man Pflanzenzellen, -gewebe oder -teile oder Protoplasten mit einem erfindungsgemäßigen Nukleinsäuremolekül, einem erfindungsgemäßigen Vektor, einer erfindungsgemäßigen Expressionskassette oder mit einer erfindungsgemäßigen Zelle, Gewebe, Pflanzenteile oder Protoplasten in einem Wachstumsmedium kultiviert und im Fall der Herstellung transgener Pflanzen daraus Pflanzen regeneriert.
- 20 Auch die Transformation monokotyler Pflanzen mittels Agrobakterium-basierender Vektoren wurde beschrieben (Chan et al., Plant Mol. Biol. 22 (1993), 491-506; Hei et al., Plant J. 6 (1994), 271-282; Deng et al., Science in China 33 (1990), 28-34; 25 Wilmink et al., Plant Cell Reports 11 (1992), 76-80; May et al., BioTechnology 13 (1995), 486-492; Conner und Domisse, Int. J. Plant Sci. 153 (1992), 550-555;
- 30

Ritchie et al., Transgenic Res. 2 (1993), 252-265; Alternative Systeme zur Transformation von monokotylen Pflanzen sind die Transformation mittels des biolistischen Ansatzes (Wan und Lemaux, Plant Physiol. 104 (1994), 37-48; Vasil et al., Bio/Technology 11 (1993), 1553-1558; Ritala et al., Plant Mol. Biol. 24 (1994), 5 317-325; Spencer et al., Theor. Appl. Genet. 79 (1990), 625-631), insbesondere die Transformation von Mais wird in der Literatur mehrfach beschrieben (z.B. WO 95/06128, EP 0 513 849, EP 0 465 875, EP 0 292 435; Fromm et al., Biotechnology 8 (1990), 833-844; Gordon-Kamm et al., Plant Cell 2 (1990), 603-618; Koziel et al., Biotechnology 11 (1993), 194-200; Moro et al., Theor. Appl. Genet. 80 10 (1990), 721-726). Darüber hinaus stellen die Protoplastentransformation, die Elektroporation von partiell permeabilisierten Zellen oder die Einbringung von DNA mittels Glasfasern alternative, dem Fachmann bekannte Verfahren dar.

Auch die erfolgreiche Transformation anderer Getreidearten wurde bereits beschreiben, z.B. für Gerste (Wan und Lemaux, s.o.; Ritala et al., s.o.; Krens et al., Nature 296 (1982), 72-74) und für Weizen (Becker et al., Plant J. (1994) 5 (2): 229-307; Nehra et al., Plant J. 5 (1994), 285-297).

Für Reis wurden unterschiedliche Transformationsmethoden beschrieben, wie z.B. die Agrobakterium-vermittelte Transformation (Hiei et al., Plant J. 6 (1994), 271-282; Hiei et al., Plant Mol. Biol. 35 (1997), 205-218; Park et al., J. Plant Biol. 38 (1995), 365-371), die Protoplasten-Transformation (Datta, In "Gene transfer to plants", Potrykus, Spangenberg (Eds.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1995, 66-75; Datta et al., Plant Mol. Biol. 20 (1992), 619-629; Sadashivam et al., Plant Cell Rep. 13 25 (1994), 394-396), der biolistische Ansatz zur Pflanzentransformation (Li et al., Plant Cell Rep. 12 (1993), 250-255; Cao et al., Plant Cell Rep. 11 (1992), 586-591; Christou, Plant Mol. Biol. (1997), 197-203) sowie die Elektroporation (Xu et al., In "Gene transfer to plants", Potrykus, Spangenberg (Eds.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1995, 201-208).

Ferner betrifft die vorliegende Erfindung auch Vermehrungsmaterial und Erzeugt der erfindungsgemäßigen Pflanzen, das erfindungsgemäß Pflanzenzellen enthält. Der Begriff "Vermehrungsmaterial" umfaßt dabei jene Bestandteile der Pflanze, die geeignet sind zur Erzeugung von Nachkommen auf vegetativem oder generativem Weg. Für die vegetative Vermehrung eignen sich beispielsweise Stecklinge, Calluskulturen, Rhizome, Wurzelstücke oder Knollen. Andere Vermehrungsmaterial umfaßt beispielsweise Früchte, Samen, Sämlinge, Protoplasten, Zellkulturen etc. Vorzugsweise handelt es sich bei dem Vermehrungsmaterial um Knollen oder Samen.

10 Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung der erfindungsgemäßigen Promotoren oder der mittels des erfindungsgemäßigen Verfahrens identifizierten Promotoren zur karyopsenspezifischen Expression von Transgenen in Pflanzen.

15 Der Begriff "Transgen" bedeutet dabei eine in eine Pflanze künstlich eingeführte DNA-Sequenz, die ein oder mehrere der erfindungsgemäßigen Nukleinsäuremoleküle enthalten.

Diese und andere Ausführungsformen sind dem Fachmann durch die Beschreibung und die Beispiele der vorliegenden Erfindung offenbart. Weiterführende Literatur kann zu einer der oben angeführten Methoden, Mittel und Verwendungen, die im Sinne der vorliegenden Erfindung angewendet werden können, dem Stand der Technik entnommen werden, z. B. aus öffentlichen Bibliotheken unter z. B. der Benutzung von elektronischen Hilfsmitteln. Zu diesem Zweck bieten sich unter anderem öffentliche Datenbanken an wie die "Medline", die über Internet zur Verfügung stehen, z. B. unter der Adresse <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/medline.html>. Weitere Datenbanken und Adressen sind dem Fachmann geläufig und können aus dem Internet entnommen werden, z. B. unter der Adresse <http://www.lycos.com>. Eine Übersicht über Quellen und Informationen zu Patenten bzw. Patentanmeldungen in der Biotechnologie ist in Berks, TIBTECH 12 (1994), 352-364 gegeben.

30

Position 1570 (+) ACACNNG

Position 1603 (+) ACACNNG

Position 2083 (+) ACACNNG

Position 298 (-) ACACNNG

5 DNA-Elemente, die an einer hormoneell regulierten Genexpression durch Auxin bzw. Ethylen beteiligt sind, wurden an folgenden Positionen gefunden:

Auxin response factor (ARF A.thaliana) Position 2997 (-) TGTCTC

NBBF1 Motiv (rolB)

Position 614 (+) ACTTTA

Position 793 (+) ACTTTA

Ethylen RE (L.esculentum4)

Position 3035 (+) AWTTCAAA

Position 3041 (+) AWTTCAAA

10 DNA-Elemente, die für eine Licht- oder Temperatur-regulierte Genexpression stehen, wurden an folgenden Positionen im GBSS I-Promotor gefunden:

I-Box

Position 713 (-) GATAA

Position 798 (-) GATAA

Low Temperature RE (H. vulgare)

Low Temperature RE (A.thaliana)

Position 1019 (+) ACCGACA

Position 1020 (+) CCGAC

Position 1324 (+) CCGAC

Position 1749 (-) CCGAC

Position 2536 (-) CCGAC

15 Neben anderen bekannten DNA-Motiven (GT1-Box, MART-Boxen, DOF-Boxen, Myb- und Myc-Boxen) enthält der unter SEQ ID No.1 aufgeführte Promotor weitere, bisher unbekannte Sequenzmotive. Ein DNA-Sequenzmotiv (CCACACACTACAA) an Position 2.292 zeigt Homologien zu DNA-Sequenzabschnitten des gbssI.

Promotors aus Gerste und einem DNA-Bereich im Puroindolin-Promotor aus Weizen (Digeon et al. (1999) Plant Mol. Biol. 39: 1101-1112; Acc. No. AJ000548), der in Reis die Expression des GUS-Reportergens in Endosperm, Aleuronzellen und im Perikarp reguliert. Repeats der Sequenz (CA)_n befinden sich an den Positionen 948-956, 1.007-1.015 und 1.024-1.030. Ein sich wiederholendes Sequenzmotiv (CTCAC) befindet sich an den Positionen 1.259 und 1.287. Zwei direkte Sequenzwiederholungen (ACGTACGT) befinden sich an den Positionen 1.344 und 1.349. Weitere Sequenzwiederholungen (GAGAGC) befinden sich an Position 1.558, Position 1.614 (CGGGTG) und 1.644 (CCGACGG). Ein Motiv der Sequenz (GAA)_n befindet sich an Position 1.888. Ein sich wiederholendes Motiv der Sequenzbereiche, die Homologien zum GBSS I-Promotorbereich aus Gerste (GenBank Acc. No. X07931) aufweisen, befinden sich an den Positionen 2.332 und 2.391 bis 2.435. (10) (AACAC)_n befindet sich an Position 1.888. Ein sich wiederholendes Motiv der Sequenzbereiche, die Homologien zum GBSS I-Promotorbereich aus Gerste (GenBank Acc. No. X07931) aufweisen, befinden sich an den Positionen 1.383-1.406 (95% Sequenzidentität), 2.145-2.188 (93% Sequenzidentität) und 2.238-2.293 (90% Sequenzidentität).

15 Ein weiterer entdeckungsgemäßer Promotor, der durch SEQ ID No.2 repräsentiert ist, beinhaltet DNA des genomischen ss2-Subkrons p8/C wie durch DSM 13397 hinterlegt. Die Position 1-2.444 in SEQ ID No. 2 entspricht dem 5'-flankierenden Bereich des Gens. Der Subkton p8/C enthält außerdem 373 Basen des kodierenden Bereichs der S II (Position 2.445 bis 2.818). Ein Intron mit einer Länge von 91 Basen liegt an Position 2.709 bis 2.800.

20 Der isolierte cDNA-Klon der SS II (WO 97/45545 A1) zeigt mit der in SEQ ID No.2 (= ss II-Promotor) aufgeführten genomischen Sequenz im 5' untranslatierten Bereich (Position 2.273 bis 2.708) eine Homologie von 89%. Im ersten Exon (Position 2.445 bis 2.708) besteht zu dieser cDNA-Sequenz eine 92,6%ige Sequenzidentität.

25 Im dem 5'-flankierend vom Startcodon gelegenen Bereich der unter SEQ ID No.2 beschriebenen DNA-Sequenz liegen verschiedene cis-regulatorische Elemente,

30 an Position 2.292 zeigt Homologien zu DNA-Sequenzabschnitten des gbssI.

Endosperm- bzw. samenspezifische DNA-Elemente wurden an folgenden Positionen im SS II-Promotor gefunden:

-300 Motiv (Zeil, Z. mays) Position 2228 (+) TGTAAG

-300 Elemente (Gliadine, Glutenine) Position 897 (+) TGHAAARK

Position 1057 (+) TGHAAARK

Position 1169 (+) TGHAAARK

Napin-Motiv Position 1074 (-) TACACAT

10 (2S Albumin; *Brassica napus*) Position 50 (+) CNAACAC

(CA) Element (napA-Promotor) Position 2181 (+) CNAACAC

Position 479 (-) CNAACAC

15 ACGT Motiv (Glu-B1, *Oryza sativa*) Position 242 (+) GTACGTG

Amylase-Box Position 1297 (+) TAACARA

(α -Amylase, *Triticum aestivum*)

CGACG-Element Position 86 (+) CGACG

Position 2242 (-) CGACG

Position 2245 (-) CGACG

E-Boxen (napA, B, *napus*) Position 368 (+) CANNTG

Position 745 (+) CANNTG

Position 1053 (+) CANNTG

Position 1210 (+) CANNTG

Position 1513 (+) CANNTG

Position 1784 (+) CANNTG

Position 1872 (+) CANNTG

Position 1935 (+) CANNTG

Position 2058 (+) CACGTG (G-Box)

RY repeat (CATGCATG)

Position 118 (+) CATGCATG

Position 297 (+) CATGCAY

Position 1908 (+) CATGCAT

Position 236 (-) CATGCAT

Position 368 (-) CATGCA

Position 118 (+) CATGCAT

Position 297 (+) CATGCAT

SEF1 Motiv (7S Globulin; G. max.) Position 636 (+) ATATTAAWW

Position 871 (+) ATATTAAWW

Position 703 (-) ATATTAAWW

SEF4 Motiv (7S Globulin; G. max)

15

Position 552 (+) RTTTTTR

Position 839 (+) RTTTTTR

Position 1037 (-) RTTTTTR

Position 1547 (-) RTTTTTR

Position 814 (-) RTTTTTR

Position 876 (-) RTTTTTR

Position 961 (-) RTTTTTR

Position 1069 (-) RTTTTTR

Position 1334 (-) RTTTTTR

Position 1380 (-) RTTTTTR

25 DNA-Elemente für eine pollenspezifische Genexpression wurden an folgenden Positionen gefunden:
Pollent 1 (*L. esculentum* LAT52) Position 663 (+) AGAAA

Position 216 (+) AGAAA
Position 663 (+) AGAAA

Position 663 (+) AGAAA
Position 753 (+) AGAAA

Position 772 (+) AGAAA
Position 30

31

(POX1; *Triticum aestivum*)

Position 793 (+) AGAAA	
Position 982 (+) AGAAA	
Position 1003 (+) AGAAA	
Position 1015 (+) AGAAA	5
Position 1082 (+) AGAAA	
Position 1203 (+) AGAAA	
Position 1251 (+) AGAAA	
Position 1271 (+) AGAAA	
Position 1275 (+) AGAAA	
Position 1314 (+) AGAAA	10
Position 1342 (+) AGAAA	
Position 1350 (+) AGAAA	
Position 1656 (+) AGAAA	
Position 1677 (+) AGAAA	
Position 1744 (+) AGAAA	15
Position 537 (-) AGAAA	

Elemente, die an einer durch Zucker regulierten Genexpression beteiligt sind
wurden an folgenden Positionen gefunden:

20	ACGT-A-Box (α -Amylase; <i>O. sativa</i>)	Position 2211(+)-TACGTA
	CGACG-Element (AMY3; <i>O. sativa</i>)	Position 86 (+) CGACG
		Position 2242 (-) CGACG
		Position 2245 (-) CGACG
25	SURE-1	Position 1741 (+) AACAGAAAA
	(bez-Promotor, <i>Arabidopsis thaliana</i>)	

- Wurzelspezifische DNA-Elemente wurden im SS II-Promotor an folgenden Positionen gefunden:
30 Positionen gefunden:
Wurzel Motiv Position 534 (+) ATATT

32

(POX1; <i>Triticum aestivum</i>)	
Position 636 (+) ATATT	
Position 871 (+) ATATT	
Position 1026 (+) ATATT	
Position 1031 (+) ATATT	5
Position 1036 (+) ATATT	
Position 533 (-) ATATT	
Position 613 (-) ATATT	
Position 652 (-) ATATT	
Position 688 (-) ATATT	
Position 701 (-) ATATT	10
Position 707 (-) ATATT	
Position 870 (-) ATATT	
Position 1062 (-) ATATT	
Position 1161 (-) ATATT	
DNA-Elemente, die an einer hormonell regulierten Genexpression durch ABA oder GA beteiligt sind, wurden an folgenden Positionen gefunden: 15	
ABRE Motiv A (Em; <i>O. sativa</i>)	
Position 243 (+) TACGTGTC	
Pyrimidin-Box (EBP1; <i>O. sativa</i>)	20
Position 1222 (+) TTTTTTCC	
Position 1242 (+) TTTTTTCC	
DPBTF Motiv (Dc3; <i>Daucus carota</i>)	
Position 2224 (+) ACACCNNG	25
LTR-E (cor15a; <i>A. thaliana</i>)	
Position 85(+)-CCGAC	
Position 42(-)-CCGAC	

- Elemente, die an einer hormonell regulierten Genexpression durch Auxin bzw.
30 Ethylen beteiligt sind, wurden an folgenden Positionen gefunden:
ASF-1 Motiv (CaMV 35S)

Position 1456 (+) TGACG

Position 1791 (-) TGACG
 Position 1808 (-) TGACG

Position 2997 (-) TGTCTC

Auxin response factor

5 (ARF; A. thaliana)

NIBBF-1 Motiv (rolB; A. rhizogenes)

Position 1464 (+) ACTTTA

Ethylen RE (E4; L. esculentum)

Position 1033 (+) AWTTCAAA

10 DNA-Elemente, die für eine Licht- oder Temperatur-regulierte Genexpression stehen, wurden an folgenden Positionen im SS II-Promotor gefunden:

I-Box Position 648 (+) GATAA

Position 672 (-) GATAA

Position 830 (-) GATAA

Position 1566 (-) GATAA

Position 1682 (-) GATAA

Position 1849 (-) GATAA

Low Temperature RE
 (cor15a; A. thaliana)

Position 85 (+) CCGAC

Position 42 (-) CCCGAC

Neben weiteren bekannten DNA-Motiven (GT1-Consensus, G-Box, MART-Boxen, ARS-Elementen, DOF-Boxen, GATA-Motiven, Myb- und Myc-Boxen) enthält der unter SEQ ID No.2 aufgeführter ssII-Promotor weitere, bisher unbekannte

25 Sequenzmotive. Dazu gehört ein Motiv der Sequenz ATAAAAATGT, das in einer etwa 300 Basen langen DNA-Region des SS II-Promotors insgesamt neun mal auftritt (Position 774, 795, 877, 920, 941, 962, 1038, 1070, 1085). Das

Sequenzmotiv hat Ähnlichkeit zu dem -300 Element (TGAAAG), auch Prolamino-Box genannt (Forde et al. (1985) Nucleic Acid Research 13: 7327-7339; Mena et al. (1998) Plant J. 16: 53-62), liegt aber in einem anderen Bereich des Promotors. Die

30 Prolamino-Box wird etwa 300 Nukleotide vom Startpunkt der Translation in

Promotoren von Hordeinen (Gerste), Gliadinen und LMW-Gluteninen (Weizen), sowie α -Zainen (Mais) gefunden. Auch in der isolierten genomischen Sequenz der ssII liegt ein Element der Sequenz TGAAAG, 21bp stromaufwärts vom Translationsstart.

5

- Ein sich direkt wiederholendes, kurzes Sequenzmotiv (TCTA)₄ befindet sich an Position 1.982. Weitere direkte Sequenzwiederholungen befinden sich an den Positionen 69 (GCCT)₃ und 129 (GCT)₃. Ein direktes Repeat der Sequenz AAAAATGTAATCAAGCATT befindet sich an den Positionen 962 und 1038. Im 10 5'untranslatierten Bereich, direkt vor dem Translationsstart (Position 2437 in SEQ ID No.2), befindet sich eine GC-reiche Sequenz (CCGCCGCC), die an gleicher Position auch im 5'untranslatierten Bereich des Mais zSSIIa cDNA-Klons vorliegt (Genbank Acc.No. AF019298; Harn et al. (1998) Plant Mol. Biol. 37: 639-649).
- 15 Hinterlegung von Mikroorganismen:
 Die erfundungsgemäß Nukleinsäuremoleküle SEQ ID No. 1 und 2 wurden bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) in Braunschweig, Deutschland gemäß Budapester Vertrag am 17. März 2000 (17.03.2000) mittels Plasmid DNA hinterlegt:
- 20 Plasmid p1/1 enthaltend SEQ ID No. 1 mit der Hinterlegungsnummer DSM 13398.
 Plasmid p8/C enthaltend SEQ ID No. 2 mit der Hinterlegungsnummer DSM 13397.
- Die nachfolgenden Beispiele erläutern die Erfindung ohne sie in irgendeiner Hinsicht zu beschränken.
- 25 Klonierungsverfahren
 Zur Klonierung in E.coli-/Bakterienstämme wurden die Vektoren pBluescript™ II SK(+) bzw. KS(+-) Phagemid Vektoren (Stratagene GmbH, Heidelberg, Deutschland) und Lambda Fix® II / Xhol Klonierungsvektor (Stratagene GmbH, Heidelberg, Deutschland) verwendet.

- Bakterienstämme**
Für die Blueskript-Vektoren wurden die *E.coli*-Stämme DH5 α (Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland) und Epicurian Coli SURE® (Stratagene GmbH, Heidelberg, Deutschland) verwendet. Für die Bakteriophagen-Vektoren wurde der Epicurian Coli Stamm XL1-Blue MRA (Stratagene) verwendet.
- Für molekulärbiologische Arbeitstechniken wird häufig auf Sambrook et al. 1989 verwiesen: Sambrook et al. (1989), Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Second Edition; Cold Spring Harbour Laboratory Press).
- Ausführungsbeispiele**
- 10 1. Herstellung der genomischen Weizenbank
Zur Herstellung der genomischen Weizenbanken wurde Gesamt-DNA aus etiolierten Keimlingen von *Triticum aestivum* L. cv. "Florida" isoliert. Zur Anzucht steriler etiolierter Keimlinge wurden reife Karyopsen für 20 min mit 1% NaOCl, 0,1% (v/v) Mucasol® (Merz & Co., Frankfurt, Deutschland) inkubiert und anschließend 3x mit Aqua bidest gewaschen. Die Karyopsen wurden auf sterilem MS-Medium (Murashige & Skoog (1962), Physiol. Plant. 15: 473-479), dem 0,3% (w/v) GELRITE® (Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland) zur Verfestigung zugesetzt wurde, ausgelegt. Das Wachstum erfolgte bei 26°C in Dunkelheit.
Vierzehn Tage nach dem Plättieren wurden die Keimlinge abgeschnitten und in flüssigem Stickstoff eingefroren.
- 15 2. Restriktionsenzymseparation
Für die Blueskript-Vektoren wurden die *E.coli*-Stämme DH5 α (Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland) und Epicurian Coli SURE® (Stratagene GmbH, Heidelberg, Deutschland) verwendet. Für die Bakteriophagen-Vektoren wurde der Epicurian Coli Stamm XL1-Blue MRA (Stratagene) verwendet.
- 20 3. Restriktion mit BamH I bzw. Sau3A I
Für die Blueskript-Vektoren wurden die *E.coli*-Stämme DH5 α (Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland) und Epicurian Coli SURE® (Stratagene GmbH, Heidelberg, Deutschland) verwendet. Für die Bakteriophagen-Vektoren wurde der Epicurian Coli Stamm XL1-Blue MRA (Stratagene) verwendet.
- 25 4. Restriktionsenzymseparation
Für die Blueskript-Vektoren wurden die *E.coli*-Stämme DH5 α (Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland) und Epicurian Coli SURE® (Stratagene GmbH, Heidelberg, Deutschland) verwendet. Für die Bakteriophagen-Vektoren wurde der Epicurian Coli Stamm XL1-Blue MRA (Stratagene) verwendet.
- 30 5. Extraktion der DNA aus den Keimlingen
Für die Blueskript-Vektoren wurden die *E.coli*-Stämme DH5 α (Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland) und Epicurian Coli SURE® (Stratagene GmbH, Heidelberg, Deutschland) verwendet. Für die Bakteriophagen-Vektoren wurde der Epicurian Coli Stamm XL1-Blue MRA (Stratagene) verwendet.
- 35 6. Restriktion mit BamH I bzw. Sau3A I
Für die Blueskript-Vektoren wurden die *E.coli*-Stämme DH5 α (Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland) und Epicurian Coli SURE® (Stratagene GmbH, Heidelberg, Deutschland) verwendet. Für die Bakteriophagen-Vektoren wurde der Epicurian Coli Stamm XL1-Blue MRA (Stratagene) verwendet.
- 40 7. Isolation der DNA aus den Keimlingen
Für die Blueskript-Vektoren wurden die *E.coli*-Stämme DH5 α (Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland) und Epicurian Coli SURE® (Stratagene GmbH, Heidelberg, Deutschland) verwendet. Für die Bakteriophagen-Vektoren wurde der Epicurian Coli Stamm XL1-Blue MRA (Stratagene) verwendet.
- 45 8. Restriktionsenzymseparation
Für die Blueskript-Vektoren wurden die *E.coli*-Stämme DH5 α (Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland) und Epicurian Coli SURE® (Stratagene GmbH, Heidelberg, Deutschland) verwendet. Für die Bakteriophagen-Vektoren wurde der Epicurian Coli Stamm XL1-Blue MRA (Stratagene) verwendet.
- 50 9. Isolation der DNA aus den Keimlingen
Für die Blueskript-Vektoren wurden die *E.coli*-Stämme DH5 α (Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland) und Epicurian Coli SURE® (Stratagene GmbH, Heidelberg, Deutschland) verwendet. Für die Bakteriophagen-Vektoren wurde der Epicurian Coli Stamm XL1-Blue MRA (Stratagene) verwendet.
- 55 10. Restriktion mit BamH I bzw. Sau3A I
Für die Blueskript-Vektoren wurden die *E.coli*-Stämme DH5 α (Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland) und Epicurian Coli SURE® (Stratagene GmbH, Heidelberg, Deutschland) verwendet. Für die Bakteriophagen-Vektoren wurde der Epicurian Coli Stamm XL1-Blue MRA (Stratagene) verwendet.
- 60 11. Isolation der DNA aus den Keimlingen
Für die Blueskript-Vektoren wurden die *E.coli*-Stämme DH5 α (Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland) und Epicurian Coli SURE® (Stratagene GmbH, Heidelberg, Deutschland) verwendet. Für die Bakteriophagen-Vektoren wurde der Epicurian Coli Stamm XL1-Blue MRA (Stratagene) verwendet.
- 65 12. Restriktionsenzymseparation
Für die Blueskript-Vektoren wurden die *E.coli*-Stämme DH5 α (Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland) und Epicurian Coli SURE® (Stratagene GmbH, Heidelberg, Deutschland) verwendet. Für die Bakteriophagen-Vektoren wurde der Epicurian Coli Stamm XL1-Blue MRA (Stratagene) verwendet.
- 70 13. Isolation der DNA aus den Keimlingen
Für die Blueskript-Vektoren wurden die *E.coli*-Stämme DH5 α (Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland) und Epicurian Coli SURE® (Stratagene GmbH, Heidelberg, Deutschland) verwendet. Für die Bakteriophagen-Vektoren wurde der Epicurian Coli Stamm XL1-Blue MRA (Stratagene) verwendet.
- 75 14. Restriktionsenzymseparation
Für die Blueskript-Vektoren wurden die *E.coli*-Stämme DH5 α (Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland) und Epicurian Coli SURE® (Stratagene GmbH, Heidelberg, Deutschland) verwendet. Für die Bakteriophagen-Vektoren wurde der Epicurian Coli Stamm XL1-Blue MRA (Stratagene) verwendet.
- 80 15. Isolation der DNA aus den Keimlingen
Für die Blueskript-Vektoren wurden die *E.coli*-Stämme DH5 α (Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland) und Epicurian Coli SURE® (Stratagene GmbH, Heidelberg, Deutschland) verwendet. Für die Bakteriophagen-Vektoren wurde der Epicurian Coli Stamm XL1-Blue MRA (Stratagene) verwendet.
- 85 16. Restriktionsenzymseparation
Für die Blueskript-Vektoren wurden die *E.coli*-Stämme DH5 α (Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland) und Epicurian Coli SURE® (Stratagene GmbH, Heidelberg, Deutschland) verwendet. Für die Bakteriophagen-Vektoren wurde der Epicurian Coli Stamm XL1-Blue MRA (Stratagene) verwendet.
- 90 17. Isolation der DNA aus den Keimlingen
Für die Blueskript-Vektoren wurden die *E.coli*-Stämme DH5 α (Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland) und Epicurian Coli SURE® (Stratagene GmbH, Heidelberg, Deutschland) verwendet. Für die Bakteriophagen-Vektoren wurde der Epicurian Coli Stamm XL1-Blue MRA (Stratagene) verwendet.
- 95 18. Restriktionsenzymseparation
Für die Blueskript-Vektoren wurden die *E.coli*-Stämme DH5 α (Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland) und Epicurian Coli SURE® (Stratagene GmbH, Heidelberg, Deutschland) verwendet. Für die Bakteriophagen-Vektoren wurde der Epicurian Coli Stamm XL1-Blue MRA (Stratagene) verwendet.

DNA und nachfolgend eine Präzipitation der DNA mit 1/10 Vol. 3M NaAc und 2,5 Vol. EtOH (absolut).

1.1. Ligation in Lambda Fix® II/Xho I Partial Fill-In Vektoren (Stratagene GmbH, Heidelberg, Deutschland)

Die BamH I bzw. Sau3A I restriktierte genomische DNA wurde in den Lambda Fix® II/Xho I Klonierungsvektor nach Angaben des Herstellers (Stratagene GmbH, Heidelberg, Deutschland) ligiert. Der Ligationsansatz enthielt: 1 µl des Lambda Fix® II Vektors, 0,4 µg BamH I bzw. Sau3A I restriktierte genomische DNA, 0,5 µl 10x Ligationspuffer, 2 Weiss Units T4 DNA-Ligase (MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland); Weiss et al. (1968) J. Biol. Chem., 243: 4543-4555) in einem Endvolumen von 5 µl.

1.2. In vitro Verpackung der Ligationsprodukte

15 Zur Verpackung der Lambda Phagen wurde das *in vitro*-Verpackungskit "Gigapack® II Gold" der Firma Stratagene (Stratagene GmbH, Heidelberg, Deutschland) verwendet und den Angaben des Herstellers gefolgt.

Von den Ligationsansätzen wurden jeweils 1 µl zu den Verpackungsansätzen dazugegeben und im Folgenden den Angaben des Herstellers gefolgt.

1.3. Anzucht der Bakterien zur Phagenvermehrung

Zur Phagenvermehrung wurde der *E.coli*-Bakterienstamm XL1-Blue MRA (P2) verwendet. Die Bakterien wurden in LB-Medium mit 10 mM MgSO₄, 0,2% (w/v) Maltose bis zu einer OD 600 = 0,5 bei 37°C, 180 rpm angezogen. Anschließend wurden die Bakterien bei 2000 rpm, 10 min, 4°C pelletiert und der Überstand verworfen. Das Bakterienpellet wurde in 10 mM MgSO₄ resuspendiert und die Bakteriendichte auf OD600 = 0,5 eingestellt.

Zur Phagenvermehrung wurden aus den Verpackungsansätzen 1 µl aus den Originalansätzen bzw. 1:10 Verdünnung der Origininalansätze mit 200 µl

Bakteriensuspension (OD600 = 0,5) gemischt und 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die einzelnen Ansätze mit 3 ml TOP-Agarose (48°C) gemischt und auf NZY-Festmedium nach Herstellerangaben (s.o. Lambda Fix® II/Xho I Partial Fill-In Vektoren, Stratagene) plattiert. Die Platten wurden für ca. 16 h bei 33°C inkubiert.

- 5 Die Phagentiter der Sau3A I bzw. der BamH I genomicischen Banken wurden durch Auszählen der Phagenplaques bestimmt. Für die Sau3A I bzw. die BamH I Primärbanken wurden Phagentiter von $2,2 \times 10^7$ pfu/ml bzw. $1,4 \times 10^7$ pfu/ml ermittelt. Zur Bestimmung der durchschnittlichen Insertgrößen wurden von jeder Bank 10 einzelne Phagenklone amplifiziert, die Phagen-DNA isoliert (Sambrook et al. 1989) und die Insertgrößen nach Restriktionsverdau und gelektrophoretischer Auf trennung ermittelt. Die durchschnittliche Insertgröße beträgt ca. 15,0 Kb für die BamH I bzw. 15,6 Kb für die Sau3A I Bank.
- 10 15 1.4. Amplifizierung der genomicischen Banken Zur Herstellung repräsentativer, amplifizierter genomicischer Banken wurden von jeder Bank ca. 4,5 Millionen pfu plattiert. Die Amplifizierung erfolgte nach den Angaben des Herstellers (Stratagene). Die Phagentiter der amplifizierten Banken betrug $6,3 \times 10^9$ pfu/ml (BamHI-Bank) bzw. $2,0 \times 10^9$ pfu/ml (Sau3A I-Bank).
- 20 2. Durchmuster der genomicischen Banken Die Identifizierung und Isolierung von Phagenklonen, deren genomische Inserts Sequenzen der gbs1- bzw. ss1-Gene tragen, erfolgte über Plaque-Hybridisierung. Zum Durchmuster der genomicischen Banken wurden ca. 500.000 Phagen von jeder Bank ausplattiert. Das Ausplattieren der Phagen und Abziehen der Platten erfolgte nach Standardprotokollen (Sambrook et al., 1989; Stratagene Lambda Fix® II Manual). Als genspezifische Sonden wurden DNA-Fragmente von cDNA-Klonen der GBSS I (Block, M. (1997) "Isolation, Charakterisierung und Expressionsanalysen

von Stärkesynthase-Genen aus Weizen (*Triticum aestivum L.*)*, Dissertation,
Universität Hamburg) und einer SSII (WO 97/45545 A1) eingesetzt.

Die verwendete SSII-Sonde wurde mit sequenzspezifischen Primern über eine PCR-
5 Reaktion aus einem isolierten ssII cDNA-Klon amplifiziert. Die Markierung des
772bp großen Amplifikationsprodukts (Position 1264-1972 der ssII cDNA) erfolgte
während der PCR-Reaktion durch den Einbau von DIG-dUTPs (Roche Diagnostics
GmbH, Mannheim).

Der PCR-Reaktionsansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

- | | | | |
|----|--|----|---|
| 10 | 10µl PCR-Puffer (10x conc.; Life Technologies) | 5 | W1: 5'-ATGGCGGGCTCTGGTCACGGTC-3' (SEQ ID No. 5)
W2: 5'-AGGCCGCCAGTCCTTGCTCCA-3' (SEQ ID No. 6) |
| 10 | 3µl MgCl ₂ (50mM; Life Technologies) | 10 | 10µl PCR-Puffer (10xconc.; Life Technologies) |
| 10 | 3.5µl DIG dUTPs (1nmol/µl; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) | 10 | 3µl MgCl ₂ (50mM; Life Technologies) |
| 10 | 10µl dNTP-Mix (je 2.5mM) | 10 | 3µl DIG dUTPs (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) |
| 10 | 5µl Primer LW2 (10pmol/µl) | 10 | 3.5µl dNTP-Mix (je 5mM) |
| 15 | 5µl Primer LW9 (10pmol/µl) | 15 | 6µl Primer W1 (10pmol) |
| 15 | 50ng Template (cDNA-Klon der ssII) | 15 | 6µl Primer W2 (10pmol) |
| | 0.5µl Taq-Polymerase (5U/µl; Life Technologies) | 15 | 10ng Template (cDNA-Klon der ssII) |
| | ad 100µl ddH ₂ O | 20 | 10µl Taq-Polymerase (5U/µl; Life Technologies) |
| | | 20 | ad 100µl ddH ₂ O |

Die Bedingungen für die PCR waren folgendermaßen:

- | | | | |
|------|--|-------|--------------------------------------|
| I. | 94°C, 2min, 30sec | VI. | 94°C, 5min |
| II. | 94°C, 45sec | VII. | 94°C, 30sec |
| III. | 60°C, 45sec | VIII. | 62°C, 30sec |
| IV. | 72°C, 2min, 30sec (IV.-> II. 29 Schleifen) | IX. | 72°C, 60sec (IV.-> II. 29 Schleifen) |
| V. | 72°C, 3min | X. | 72°C, 5min |

Die Bedingungen für die PCR waren folgendermaßen:

- | | |
|----|--|
| 20 | VI. 94°C, 5min |
| 20 | VII. 94°C, 30sec |
| 20 | VIII. 62°C, 30sec |
| 25 | IX. 72°C, 60sec (IV.-> II. 29 Schleifen) |
| 25 | X. 72°C, 5min |

Die Sequenzen der ssII-spezifischen Primer für die Amplifikation der PCR-Sonde:
LW2: 5'-CTGCTGGACAGGATAATGGAA-3' (SEQ ID No. 3)

LW9: 5'-TCGGCTGCAGGGCCTCTT-3' (SEQ ID No. 4)

Die Markierung eines 283bp großen DNA-Fragments des gbssI cDNA-Klons erfolgte
über eine spezifische PCR-Reaktion, unter Einbau von DIG-markierten dUTPs

(Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland). Die PCR-Reaktion wurde mit
Primern durchgeführt, die innerhalb des ersten Exons des gbssI cDNA-Klons
(Position 146-429) liegen.

Der PCR-Reaktionsansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

- | | | | |
|----|--|----|---|
| 10 | 10µl PCR-Puffer (10xconc.; Life Technologies) | 10 | 10µl PCR-Puffer (10xconc.; Life Technologies) |
| 10 | 3µl MgCl ₂ (50mM; Life Technologies) | 10 | 3µl MgCl ₂ (50mM; Life Technologies) |
| 10 | 3.5µl DIG dUTPs (1nmol/µl; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) | 10 | 3.5µl dNTP-Mix (je 5mM) |
| 10 | 10µl dNTP-Mix (je 2.5mM) | 10 | 6µl Primer W1 (10pmol) |
| 10 | 5µl Primer LW2 (10pmol/µl) | 10 | 6µl Primer W2 (10pmol) |
| 15 | 5µl Primer LW9 (10pmol/µl) | 15 | 10ng Template (cDNA-Klon der ssII) |
| 15 | 50ng Template (cDNA-Klon der ssII) | 15 | 10µl Taq-Polymerase (5U/µl; Life Technologies) |
| | 0.5µl Taq-Polymerase (5U/µl; Life Technologies) | | ad 100µl ddH ₂ O |

Die Bedingungen für die PCR waren folgendermaßen:

- | | |
|----|--|
| 20 | VI. 94°C, 5min |
| 20 | VII. 94°C, 30sec |
| 20 | VIII. 62°C, 30sec |
| 25 | IX. 72°C, 60sec (IV.-> II. 29 Schleifen) |
| 25 | X. 72°C, 5min |

Die Prähybridisierung der Filter erfolgte in 5x SSC, 3% Blockingreagenz (Boehringer
Mannheim), 0.2% Na-dodecylsulfat (SDS), 0,1% N-Laurylsarcosin und 30µg/ml
Heringssperma-DNA bei 65°C im Wasserbad. Die Hybridisierung mit den DIG-
markierten DNA-Sonden (6ng/ml Hybridisierungslösung) erfolgte über Nacht bei
65°C im beschriebenen Standard-Hybridisierungspuffer. Alle weiteren Schritte der

- | | |
|----|----|
| 30 | 30 |
|----|----|

Chemilumineszenz-Reaktion mit CSPD® erfolgten nach Angaben des Herstellers (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland).

Positive Plaques wurden ausgestochen und über zwei weiteren Runden der 5 Amplifikation und Plaque-Filterhybridisierung vereinzelt. Die DNA der isolierten positiven Phagen wurden gemeinsam Qiagen® Lambda Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland), mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten und nach einer Agarose-Gelelektrophorese in Southern-Hybridisierungen mit den bereits beschriebenen Sonden analysiert.

Über Southern-Hybridisierungen erfolgte die Isolierung von *gbssi*- bzw. *ssii*-spezifischen Klonen mit 5'-stromaufwärts gelegenen regulativen Elementen. Dazu wurde für die *SSII* eine weitere Digoxigenin-markierte Sonde hergestellt, die im äußeren 5'-Bereich der cDNA-Sequenz liegt. Die Sonde erstreckt sich vom 1- untranslatierten Bereich des cDNA-Klons der *ssII* bis in das erste Exon (Position 1-218 der *ssII*-cDNA aus WO 97/45545 A1). Das Fragment wurde aus der cDNA der *ssII* (in pBluescript™ SK II) über einen Restriktionsverdau mit *Sma*I herausgeschnitten und nach der Auf trennung über eine Agarosegelektrophorese isoliert. Die Markierung des *Sma*I-Fragments erfolgte über Random Priming mit dem DIG DNA Labeling Kit nach Angaben des Herstellers (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland).

Für die Sequenzierung der genomischen Klone der GBSS I und SSII und ihrer 5'-stromaufwärts gelegenen regulativen Elemente wurde die Firma SeqLab GmbH (Göttingen) beauftragt.

5. Klonierungen von Promotor-Testvektoren
Die Funktionsfähigkeit der in SEQ ID No.1 und SEQ ID No.2 aufgeföhrten 5' flankierenden DNA-Bereiche wurde in transienten und stabilen Expressionsanalysen überprüft. Als Reportergen wurde das Gen der β -Glucuronidase (*GUS*) verwendet (Jefferson (1987) Plant Molecular Biology Reporter Vol. 5 (4): 387-405). Es wurden Promotor-Testvektoren kloniert, in denen die codierende Region des *gus*-Gens (*uidA*) unter Kontrolle des in SEQ ID No.1 (Position 1-3-163) oder SEQ ID No.2 (Position 1-2-445) aufgeföhrten 5' flankierenden DNA-Bereichs steht. Die Klonierung erfolgte als transkriptionale Fusion. Zunächst wurde das *uidA*-Gen über einen partiellen Verdau zusammen mit dem nos-Terminator aus dem Vektor pCal-GUS (*uidA*-Gen unter Kontrolle des CaMV 35S-Promoters; Chris Warren, Stanford Universität, unveröffentlicht) herausgeschnitten und hinter die Multiple Cloning Site von pBluescript (Stratagene) kloniert. Der so erzeugte promotorlose Vektor (*uidA-nos*) wurde für die weiteren Klonierungen verwendet.
- 10 Über Southern-Hybridisierungen erfolgte die Isolierung von *gbssi*- bzw. *ssii*-spezifischen Klonen mit 5'-stromaufwärts gelegenen regulativen Elementen. Dazu wurde für die *SSII* eine weitere Digoxigenin-markierte Sonde hergestellt, die im äußeren 5'-Bereich der cDNA-Sequenz liegt. Die Sonde erstreckt sich vom 1- untranslatierten Bereich des cDNA-Klons der *ssII* bis in das erste Exon (Position 1-218 der *ssII*-cDNA aus WO 97/45545 A1). Das Fragment wurde aus der cDNA der *ssII* (in pBluescript™ SK II) über einen Restriktionsverdau mit *Sma*I herausgeschnitten und nach der Auf trennung über eine Agarosegelektrophorese isoliert. Die Markierung des *Sma*I-Fragments erfolgte über Random Priming mit dem DIG DNA Labeling Kit nach Angaben des Herstellers (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland).
- 15 Klonierung der λ -Phagenklone in bakterielle Vektoren (pBluescript™ II) Die genomischen Insets der positiven Phagenklone wurden mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten. Die resultierenden Subfragmente wurden in bakterielle Vektoren (pBluescript™ II SK(+/-) bzw. KS(+/-) Phagemid Vektoren; Stratagene GmbH, Heidelberg, Deutschland) kloniert.
- 20 Auch die 5'-untranslatierte Leadersequenz einer mRNA kann einen Einfluß auf die gewebespezifische Expression eines Gens haben (Rouster et al.(1998) Plant J. 15 (3): 435-40). Die klonierten Promotor-Testvektoren beinhalten daher diesen Bereich des GBSS I- oder des SSII -Gens. In der gewählten Klonierungsstrategie liegt das Start-Codon der β -Glucuronidase an der Position des Start-Codons der GBSS I oder der SS II.
- 25 Klonierung der GBSS I-Promotor-Testvektoren
Das Ausgangskonstrukt des GBSS I-Promotor-Testvektors trägt 4,0kb des 5' flankierenden DNA-Bereichs der GBSS I. Die Klonierung in den promotorlosen *uidA-nos*-Vektor erfolgte über einen Restriktionsverdau der Plasmide p11/1 (gbss I)
- 30 5.1. Klonierung der GBSS I-Promotor-Testvektoren
Das Ausgangskonstrukt des GBSS I-Promotor-Testvektors trägt 4,0kb des 5' flankierenden DNA-Bereichs der GBSS I. Die Klonierung in den promotorlosen

4. Sequenzanalysen

und uidA-nos mit den Enzymen Ncol und SacI. Der 4.000 Basen lange 5' flankierende Bereich wurde anschließend durch unterschiedliche Deletionen verkürzt, was zur Entfernung von DNA-Bereichen führte, in denen die beschriebenen DNA-Elemente liegen. Der GBSS I-Promotortestvektor wurde im 5' flankierenden Bereich durch Restriktionen mit unterschiedlichen Restriktionsenzymen deletiert. Es wurden folgende Deletionskonstrukte des GBSS I-Promotors kloniert:

- 1,9 GBSS I / GUS (XbaI-Restriktion an Position 1240; enthaltend die Nukleotide 1241-3103 von SEQ ID No.1);
- 1,6 GBSS I / GUS (SmaI-Restriktion an Position 1514; enthaltend die Nukleotide 1515-3103 von SEQ ID No.1);
- 1,3 GBSS I / GUS (KpnI-Restriktion an Position 1826; enthaltend die Nukleotide 1827-3103 von SEQ ID No.1);
- 1,0 GBSS I / GUS (BamHI-Restriktion an Position 2185; enthaltend die Nukleotide 2186-3103 von SEQ ID No.1) und
- 0,4 GBSS I / GUS (Bgl II-Restriktion an Position 2740; enthaltend die Nukleotide 2705-3103 von SEQ ID No.1).

- 5.2. Klonierung der SS II-Promotortestvektoren**
- Das Ausgangskonstrukt der ssII-Promotortestvektoren trägt 2.445bp der 5'-flankierenden genomischen Sequenz der SS II. Die Klonierung des SS II-Promotortestvektors wurde mit der Methode des "Splicing by Overlap Extension" (Horton (1997) Methods in Molecular Biology Vol.67: PCR Cloning Protocols (14); 141149, White Humana Press Inc.) durchgeführt. Zuerst wurde ein Fragment des 25 genomischen SS II-Subklangs p8/C über einen Restriktionsverdau mit SacI und SmaI in das promotorlose Plasmid uidA-nos kloniert.

Die Erzeugung von Intermediär-Produktaten für die Methode des "Splicing by Overlap Extension" erfolgte unter Einsatz folgender Primerpaare:

- a) Amplifizierungsreaktion mit genomischem SS II-Subklon als Matrize:

43	SOE-A	5'-TCACGTGGATTCTGCAACCTC-3' (SEQ ID No. 7)
	SOE-B	5'-CAGGACGGACCATTGGCGGGCCGGAT-3' (SEQ ID No. 8)
	b)	Amplifizierungsreaktion mit Plasmid pCalGUS als Matrize:
5	SOE-C	5'-CGCCGCCATGGTCCGTCTGTAGAAACCC-3' (SEQ ID No. 9)
	SOE-D	5'-GTGATGTCAAGGTTGAAC TG C-3' (SEQ ID No. 10)

- Die Reaktionsansätze wurden nach Horton (Methods in Molecular Biology (1997) Vol.67: PCR Cloning Protocols (14); 141149, White Humana Press Inc.) angesetzt, die Bedingungen für die PCR waren folgendermaßen:
- I. 94°C, 90sec
 - II. 94°C, 1min
 - III. 64°C, 1min
 - IV. 72°C, 1min (IV. → II. 20 Schleifen)
 - 15 V. 72°C, 3min
- Die Amplifizierung des PCR-Produkts für die Klonierung erfolgte mit den Primersequenzen SOE-A und SOE-D. Als Matrize dienten die erzeugten Intermediärprodukte. Der Reaktionsansatz wurde nach Horton (Methods in Molecular Biology (1997) Vol.67: PCR Cloning Protocols (14); 141149, White Humana Press Inc.) angesetzt, die PCR-Reaktionsbedingungen waren wie folgt:
- 20 I. 98°C, 2min
 - II. 94°C, 1min
 - III. 68°C, 2min
 - IV. 72°C, 2min (IV. → II. 25 Schleifen)
 - V. 72°C, 10min

- Die Klonierung des resultierenden PCR-Produktes zwischen den SS II-Promotor und das uidA-Gen erfolgte nach einem Restriktionsverdau mit dem Enzymen Not I (Schnittstelle im SS II-Promotor) und Bial (Schnittstelle im uidA-Gen). Der 2.445 Basen lange Bereich des SS II-Promotors wurde anschließend durch Deletionen im 30

- 5' flankierenden Bereich verkürzt, dadurch wurden Bereiche mit beschriebenen DNA-Elementen im Promotor entfernt: Die Deletionen des SS II-Promotortestvektors wurde durch Restriktionen mit unterschiedlichen Restriktionsenzymen durchgeführt.
- Folgende Deletionskonstrukte des SS II -Promotors wurden kloniert:
- 5 -2,05 SS II / GUS (KpnI-Restriktion an Position 398; enthaltend die Nukleotide 399-2444 von SEQ ID No.2);
- 10 -1,11 SS II / GUS (SphI-Restriktion an Position 1330; enthaltend die Nukleotide 1331-2444 von SEQ ID No.2);
- 15 -0,61 SSII / GUS (HindIII-Restriktion an Position 1833; enthaltend die Nukleotide 1834-2444 von SEQ ID No.2);
- 20 -0,53 SSII / GUS (SphI-Restriktion an Position 1912; enthaltend die Nukleotide 1913-2444 von SEQ ID No.2) und
- 0,28 SSII / GUS (NotI-Restriktion an Position 2164; enthaltend die Nukleotide 2165-2444 von SEQ ID No.2).

- 15 6. Transiente Expressionsanalysen der Promotor-Testvektoren
Die Funktionsfähigkeit der isolierten Promotorkonstrukte wurde in transienten Expressionsanalysen überprüft. Die Tests wurden mit den aus Beispiel 5 erhaltenen GBSS I- und SS II- Promotortestvektoren und ihren Deletionskonstrukten durchgeführt.
- 20 Die transienten Expressionsanalysen erfolgten nach biolistischer Transformation von verschiedenen Geweben (Karyopsen, Embryonen, Blätter, Wurzeln) von Weizen. Die Transformation von Embryonen, Blätter und Wurzeln wurde nach Becker *et al.* (Plant J. (1994) 5 (2): 229-307) durchgeführt, während die biolistische Transformation des Endosperms von Karyopsen modifiziert nach Mena *et al.* (Plant J. (1998) 16(1), 53-62) erfolgte. Der Nachweis der Reportergenaktivität erfolgt durch histochemischen Nachweis der GUS-Aktivität (Jefferson (1987) Plant Molecular Biology Reporter Vol.5 (4): 387-405). Die Experimente an 10-30 Tage alten (dap), längs- und quergeschlitzten Weizenkaryopsen zeigten, daß beide Promotoren zu einer Expression des Reportergens im Endosperm führen. In den transienten Tests

war die Aktivität des uidA-Reportergens unter Kontrolle des gbss1-Promotors stärker als unter Kontrolle des ss2-Promotors.

- Folgende Deletionskonstrukte des GBSS I-Promotors erwiesen sich in transienten Expressionsanalysen als funktionsfähig:
- 5 -4,0 GBSS I / GUS, enthaltend die Nukleotide 1-3103 von SEQ ID No.1)
- 10 -1,9 GBSS I / GUS (XbaI-Restriktion an Position 1240)
- 1,6 GBSS I / GUS (SmaI-Restriktion an Position 1514)
- 1,3 GBSS I / GUS (KpnI-Restriktion an Position 1826)
- 15 -1,0 GBSS I / GUS (BamHI-Restriktion an Position 2185)
- Nach einer Deletion an Position 2.704 (-0,4 GBSS I / GUS) konnte keine GUS-Aktivität des Reportergens mehr festgestellt werden.
- Folgende Deletionskonstrukte des SS II-Promotors erwiesen sich in transienten Expressionsanalysen als funktionsfähig:
- 15 -2,45 SS II / GUS, enthaltend die Nukleotide 1-2444 von SEQ ID No.2)
- 1,11 SS II / GUS (SphI-Restriktion an Position 1330)
- 0,61 SSII / GUS (HindIII-Restriktion an Position 1833)
- 20 Das Konstrukt -0,28 SSII / GUS (NotI-Restriktion an Position 2164) zeigte dagegen keine GUS-Reportergenaktivität mehr.
7. Stabile Transformation von Weizen mit den Promotor-Testvektoren
Die in Beispiel 5 beschriebenen Promotortestvektoren und Deletionskonstrukte wurden zur Erzeugung stabil transformierter Weizenpflanzen verwendet:
- 25 -4,0 GBSS I / GUS
- 1,9 GBSS I / GUS (XbaI-Restriktion an Position 1240; SEQ ID No.1)
- 1,0 GBSS I / GUS (BamHI-Restriktion an Position 2185; SEQ ID No.1)
- 2,45 SS II / GUS
- 1,11 SS II / GUS (SphI-Restriktion an Position 1330; SEQ ID No.2)
- 0,61 SSII / GUS (HindIII-Restriktion an Position 1833; SEQ ID No.2)
- 30

Die Herstellung der transgenen Pflanzen erfolgte nach der Methode von Becker et al. (Plant J. (1994) 5 (2): 229-307). Als Selektionsmarker wurden die glufosinate- bzw. Neomycin-Resistenz tragenden Plasmiden p35S-PAT (Aventis CropScience GmbH, Frankfurt) bzw. pAct1Dneo (Müller (1992) Dissertation, Universität Hamburg) eingesetzt.

5

8. Analyse der GUS-Reportergenexpression in stabil transformierten Weizenpflanzen

Die funktionale Analyse der gbs1- und ssi1-Promotoren erfolgte nach der 10 Regeneration der transgenen Pflanzen und dem Nachweis einer stabilen und vollständigen Integration der Testkonstrukte in das Weizengenom über Southern-Analysen.

- 15 histochimischen GUS-Nachweis untersucht. Verschiedene Gewebe der Transgenen (Blätter, Wurzeln, Stiel, Endosperm, Embryo, Pollen) wurden analysiert. Die Karyopsen der mit den gbs1-Testvektoren stabil transformierten Pflanzen weisen eine starke GUS-Färbung im zentralen Stärkeendosperm auf. Die GUS-Aktivität konnte bereits in sehr jungen Karyopsen im sich entwickelnden Endosperm nachgewiesen werden. Sehr früh nach Bestäubung ist außerdem eine Aktivität des GUS-Reportergens im Perikarp nachweisbar, die in älteren Karyopsen nicht mehr auftritt. Keine GUS-Aktivität konnte dagegen im Embryo, dem Aleuron und der Embryo-umgebenden Region nachgewiesen werden. Auch im assimiliierenden Gewebe der Blätter, sowie in den Stielzellen und Wurzeln konnte keine Reportergen-Aktivität nachgewiesen werden. In transgenen Pollen wurde eine 20 GUS-Aktivität detektiert. Quantitative Analysen der Expression des Reportergens erfolgten über fluorimetrische GUS-Nachweise sowie in Northern-Blot Analysen.
- 25
2. Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 1, der ein pflanzlicher Promotor ist.
3. Expressionskassette enthaltend ein Nukleinsäuremolekül nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 - 2.
4. Vektor enthaltend ein Nukleinsäuremolekül nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 - 2 oder eine Expressionskassette nach Anspruch 3.
5. Vektor nach Anspruch 4, der zur Transformation von pflanzlichen Zellen geeignet ist.

6. Wirtszelle, die genetisch modifiziert ist mit einem Nukleinsäuremolekül nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 - 2, mit einer Expressionskassette nach Anspruch 3 oder einem Vektor nach einem oder mehreren der Ansprüche 4 - 5.

5 7. Wirtszelle nach Anspruch 6, die eine pro- oder eukaryotische Zelle ist.

8. Wirtszelle nach Anspruch 6, die eine Pflanzenzelle ist.

9. Pflanze enthaltend Pflanzenzellen nach Anspruch 8.

10. Vermehrungsmaterial oder Erzeugt von Pflanzen nach Anspruch 9, enthaltend Pflanzenzellen nach Anspruch 8.

11. Verfahren zur Herstellung transgener Pflanzenzellen nach Anspruch 8, wodin man Pflanzenzellen, -gewebe oder -teile oder Protoplasten mit einem Nukleinsäuremolekül nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 – 2, einem Vektor nach einem oder mehreren der Ansprüche 4 – 5, mit einer Expressionskassette nach Anspruch 3 oder mit einer Wirtszelle nach Anspruch 6 transformiert, und die transformierten Pflanzenzellen, -gewebe, -teile oder Protoplasten in einem

20 Wachstumsmedium kultiviert.

12. Verfahren zur Herstellung transgener Pflanzen nach Anspruch 9, wodin man Pflanzenzellen, -gewebe oder -teile oder Protoplasten mit einem Nukleinsäuremolekül nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 – 2, einem Vektor nach einem oder mehreren der Ansprüche 4 – 5, mit einer Expressionskassette nach Anspruch 3 oder mit einer Wirtszelle nach Anspruch 6 transformiert, die transformierten Pflanzenzellen, -gewebe, -teile oder Protoplasten in einem Wachstumsmedium kultiviert und daraus ganze Pflanzen regeneriert.

14. Verwendung eines Promoters nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 - 2 zur karyopsenspezifischen Expression von Genen in genetisch modifizierten Pflanzen.

Zusammenfassung

Promotoren zur Genexpression in Karbonsen von Pflanzen

SCIENCE INSTITUTE

51182 Aventis CropScience GmbH

卷之三

卷之三

אנו נודים לך / פ. גוטמן

<<140>>

Die vorliegende Erfindung stellt Promotoren bereit, die eine karyopsenspezifische

Expressionskassetten rekombinante Vektoren und Wirtszellen, die selektiv Expressionsmuster mit kontrolliertem On/Off-Zustand erzeugen.

Promotoren umfassen. Ferner werden transformierte transgene Pflanzenzellen und

10 Pflanzen beschrieben, sowie Verfahren zu deren Herstellung.

<400> 1 gttgttttccatgttg taacaggcgcg atttccttc ttttaatgg gtaatccaa tgcaatgtt 60
 ttatccat ttccatgt tttatccat gggaaatcc tttatggat agttttatc tagttcaatg ttatccat 120
 ttatccat gttttatcc gttttatccat tataccatcca tttatggat tttttatgg tttttatgg 180
 gttttatccat gttttatccat tataccatcca tttatggat tttttatgg tttttatgg 240
 gttttatccat gttttatccat tataccatcca tttatggat tttttatgg tttttatgg 300
 gttttatccat gttttatccat tataccatcca tttatggat tttttatgg tttttatgg 360
 gttttatccat gttttatccat tataccatcca tttatggat tttttatgg tttttatgg 420
 gttttatccat gttttatccat tataccatcca tttatggat tttttatgg tttttatgg 480
 gttttatccat gttttatccat tataccatcca tttatggat tttttatgg tttttatgg 540
 gttttatccat gttttatccat tataccatcca tttatggat tttttatgg tttttatgg 600
 tttttatccat gttttatccat tataccatcca tttatggat tttttatgg tttttatgg 660
 tttttatccat gttttatccat tataccatcca tttatggat tttttatgg tttttatgg 720
 tttttatccat gttttatccat tataccatcca tttatggat tttttatgg tttttatgg 780
 tttttatccat gttttatccat tataccatcca tttatggat tttttatgg tttttatgg 840
 tttttatccat gttttatccat tataccatcca tttatggat tttttatgg tttttatgg 900

2

<210> 2
<211> 2818
<212> DNA
<213> *Triticum aestivum*

<210> 4
<211> 20
<212> D_{ND}

<210> 3
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> *Triticum aestivum*
 <400> 3

	ctatataat	ctatataac	atacaagcg	ggctcttcgc	tcctttcgcc	caagccccgt	2040
tcttgtatgt	tgctttatgt	ggatcttcgt	gtatcgttgc	actcttccttc	aggcgtttgt	cacaacggac	2100
gcttccttgt	ggtctgttgt	cggtctgtcg	cggtttatcc	ccatgtttgt	ccatgtttgt	ccggccggcc	2160
cgatggcgaa	atcgagac	ccatggac	accggcagg	ggggctttcg	tcgtatccgg	2220	
cccttgttgt	aaaggccgtc	ccggccgtcc	tcgtatccgg	tcgtatccgg	ttcccccggcc	2280	
ttatcccgcc	cggtttatcc	ttatcccgcc	ttatcccgcc	ttatcccgcc	ttatcccgcc	ttatcccgcc	2340
gtatcttcgg	acttcggctt	ccatggatcc	ccatggatcc	ggatccggcc	ggatccggcc	ggatccggcc	2400
acccggccat	ctgttccat	ccatggatcc	ccatggatcc	ccatggatcc	ccatggatcc	ccatggatcc	2460
ctgttcgtcc	ggctttttcc	ggctttttcc	ggctttttcc	ggctttttcc	ggctttttcc	ggctttttcc	2520
cggggggtgg	cgccggccca	ccccacccgg	ggggccggcc	ggggccggcc	ggggccggcc	ggggccggcc	2580
cgccggccgg	caaggcttcg	gacggatgt	ggccggccgg	ggccggccgg	ggccggccgg	ggccggccgg	2640
cgatgggtgg	cgacggccgg	ggtttttttt	ggccggccgg	ggccggccgg	ggccggccgg	ggccggccgg	2700
ccaaatgggt	aggttttttt	ttatggcttt	ggccggccgg	ggccggccgg	ggccggccgg	ggccggccgg	2760
caaaatgtt	tttttttttt	aaaaatggtt	ggccggccgg	ggccggccgg	ggccggccgg	ggccggccgg	2816

8

20

20

20

20

1

<210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> *Triticum aestivum*

<210> 5
<211> 20
<212> DNA
<213> *Triticum aestivum*

```

<210> 6
<211> 20
<212> DNA
<213> Triticum aestivum

<400> 6
aggccggccag ttgtctcca

```

```

<210> 7
<211> 21
<212> DNA
<213> Triticum aestivum

<400> 7
tcacotccat tcttcacaccct 3

```

<210> 8
<211> 28
<212> DNA
<213> *Triticum aestivum*

<400> 8
ca9gacggac cattggcgaa ggcggat

28

<210> 9
<211> 29
<212> DNA
<213> *Triticum aestivum*

<400> 9
cgccgcctatg gtcccggtccctg tagaaaaccc

29

<210> 10
<211> 21
<212> DNA
<213> *Triticum aestivum*

<400> 10
gtgatgtcag cgttgaactg c

21